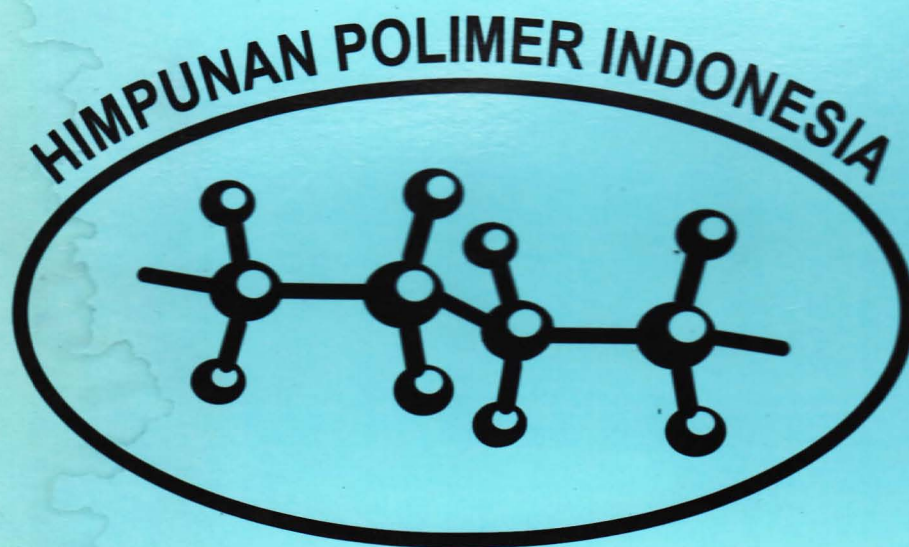


PROSIDING

Simposium Nasional Polimer VI

Serpong, 5 September 2006



HIMPUNAN POLIMER INDONESIA
2006

PROTEIN SEJENIS *SILICATEIN* DARI *SPONGE* SEBAGAI KATALIS POLIMERISASI SILIKA

Siti Nurjanah¹, Dahrul Syah¹, Ekowati Chasanah², Welxson¹,
Mr. Lukie Trianawati³ dan Maggy T. Suhartono¹

¹Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan - IPB
Kampus IPB Darmaga, PO BOX 220, Bogor

²Departemen Kelautan dan Perikanan
Jl. Medan Merdeka Timur No. 16, Jakarta Pusat

³Fakultas Bioteknologi, Universitas Atmajaya
Jl. Sudirman, Jakarta

ABSTRAK

PROTEIN SEJENIS *SILICATEIN* DARI *SPONGE* SEBAGAI KATALIS POLIMERISASI SILIKA. Silika merupakan polimer dari silikon dioksida yang banyak digunakan sebagai bahan dasar untuk industri pangan, semikonduktor, peralatan elektronik dan medis. *Sponge (Filum porifera)* merupakan organisme yang secara alamiah dapat membentuk struktur nanosilika yang spesifik dan sangat teratur pada suhu kamar dan pH netral. Sangat berbeda dengan *sponge*, di industri proses pembentukan silika ini memerlukan kondisi suhu, tekanan dan pH ekstrim disertai penambahan bahan kimia yang dapat mencemari lingkungan. Isolasi protein yang dapat mengkatalisis reaksi polimerisasi struktur nanosilika akan membuka peluang penggunaan biokatalis protein untuk membuat silika pada kondisi yang aman. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan ekstraksi dan analisis protein dari *sponge* asal perairan Pulau Nias, Binuangeun, Lombok dan Menado serta mempelajari aktivitasnya dalam mengkatalisis polimerisasi *tetraethoxyorthosilicate (TEOS)* secara invitro. Analisis berat molekul protein dengan menggunakan SDS-PAGE menunjukkan protein dari *sponge* 37MT (berasal dari Lombok) mempunyai berat molekul 18,1 kDa. Dari *sponge* lain berhasil diisolasi beberapa protein sejenis yang menunjukkan berat molekul yang bervariasi yaitu 84 kDa, 37 kDa, 27,7 kDa, 26,6 kDa, 21,4 kDa, 23,3 kDa, 16 kDa dan 15,5 kDa. Protein dengan berat molekul antara 18 kDa hingga 27 kDa merupakan protein utama yang mempunyai aktivitas katalitik yang diinginkan, sedangkan molekul protein dengan ukuran besar diduga merupakan gabungan dari beberapa unit protein. Aktivitas protein tertinggi ditemukan pada protein 37MT, yang dapat menghasilkan polimer silika dari 144,1 μ mol monomer *TEOS* selama 12 jam pada pH 6,8 dan suhu kamar.

Kata kunci : *Silicatein*, *sponge*, katalis

ABSTRACT

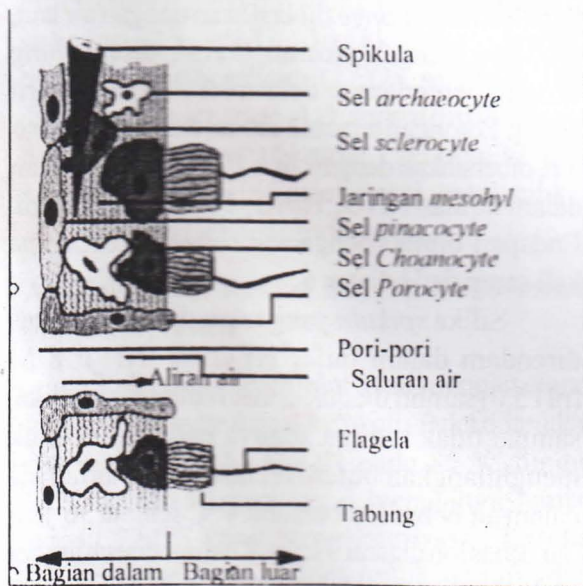
SILICATEIN LIKE PROTEIN FROM INDONESIAN SPONGE AS CATALYST SILICA POLYMERIZATION. Silica which is polymerized a silicon dioxide, is widely used as raw materials for food industry, used in semiconductor, electronic and medical equipment. Marine sponges (Phylum porifera) are living system that can produce a remarkable diversity of nanostructured silicates at ambient temperature and near-neutral pH. In contrast to living system, synthesis of these materials in industry requires extreme temperature, pressure, and pH with addition surfactant that can cause environmental pollution. Isolating protein that can catalyze nanostructured silica polymerization will make a new route for silica development under mild conditions using protein/enzyme biocatalyst. This research was aimed to extract and analyze protein from sponge live surrounding the Binuangeun Island, Nias Island, Lombok and Manado seacoast Indonesia and to study their activity to polymerize tetraethoxyorthosilicate (TEOS) invitro. Analysis of protein molecular of Sponge 37MT with SDS PAGE showed apparent molecular weight of 18.1 kDa. Several protein with estimated molecular weight of 84 kD, 37, 27.7, 26.6, 21.4, 23.3, 16 and 15.5 kDa were isolated from other sponges. The 18-27 kDa silicatein like protein appear to present as the major protein in various sponge. The higher molecular weight protein might be a multiform of protein or a structure resulted from association of the lower subunits. Protein of Sponge 37MT could polymerize 144.1 μ mol TEOS after 12 hours reaction at room temperature and near-neutral pH, while other proteins with several sizes showed lower capacity.

Key words : *Silicatein*, sponge, catalyst

PENDAHULUAN

Silika merupakan bahan dasar bagi industri-industri besar. Penggunaan bahan berbasis silika sangat luas untuk industri-industri seperti industri pangan, peralatan analisis, peralatan semikonduktor, elektronik sampai ke peralatan medis.

Beberapa organisme secara alamiah dapat membentuk struktur silika, diantaranya biota laut seperti *sponge* (Filum *porifera*) dan diatom (*Bacillariophyta*). *Sponge* mempunyai struktur tubuh yang relatif sederhana (Gambar 1). Tubuh *sponge* ditopang oleh *skeleton* internal yang disebut *spikula*. *Spikula* ini ada yang berbahan dasar silika seperti pada kelas *Demospongiae* dan *Sclerospongiae* atau kalsium karbonat seperti pada kelas *Calcarea* dan *Hexactinellida* [1,2].

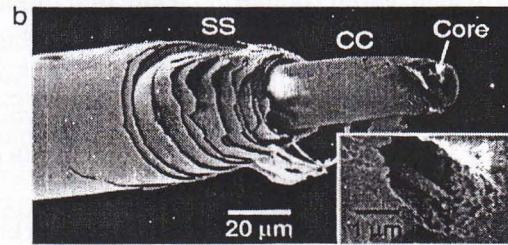


Sumber : <http://www.ucmp.berkeley.edu/porifera/pororg.html>

Gambar 1. Struktur tubuh *sponge*.

Silika *spikula* berbentuk silinder gelas yang terdiri dari lembaran silika yang tersusun secara berlapis (*streated shell*) dan di tengah terdapat pusat silinder (*cylinder core*) seperti terlihat pada Gambar 2 [3]. Lembaran silika ini terbentuk dari nanopartikel silika berukuran 50 nm sampai dengan 100 nm yang tersusun secara padat. Lembaran polimer silikon dioksida (SiO_2) ini mempunyai struktur yang sangat kuat, tidak mudah patah, tetapi fleksibel. Pada pusat silinder terdapat

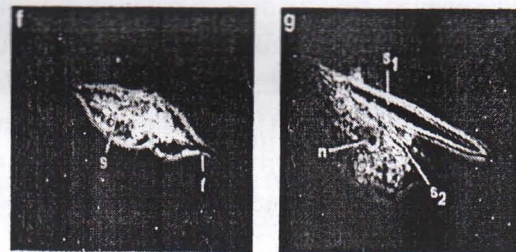
protein *silicatein* dan kandungan silikanya lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan di luarnya.



Gambar 2. Struktur silika spikula *sponge*.

Pada *sponge*, pembentukan struktur silika ini melibatkan suatu protein yang dikenal dengan protein *silicatein* [4], yang pertama kali diisolasi dari *sponge tethya aurantia*. Pada diatom, protein tersebut telah mengalami penambahan gugus karbohidrat, dan dikenal dengan nama *silaffins* [5].

Protein *silicatein* diproduksi di dalam sel *sclerocytes* kemudian disekresikan ke membran vakuola tempat terdepositnya asam silikat. Di dalam vakuola protein terus memanjang dan dilapisi dengan silika yang terkondensasi dan terpolimerisasi olehnya, kemudian setelah membentuk *spikula* dengan panjang yang cukup protein dan *spikula* ini disekresikan ke luar sel. Sekresi protein ini dibuktikan dari foto mikroskop elektron pada Gambar 3 [3].



Gambar 3. SEM dari proses sekresi silika *spikula* dengan protein (a). protein dan *spikula* memanjang (b). protein dan *spikula* keluar dari sel.

Protein ini telah diisolasi dan ditemukan tiga pita protein dengan berat molekul 29 kDa, 28 kDa dan 27 kDa yang kemudian sub unit α , sub unit β dan sub unit γ . Peneliti lain menyebutnya sebagai 3 protein isomer, karena satu sub unit saja mampu melakukan reaksi katalisis sendiri terlepas dari sub unit lainnya. Ketiga protein ini mempunyai susunan asam amino yang hampir sama. Ketiganya

tersusun secara berulang membentuk protein filamen, yang diduga melalui ikatan nonionik dan nonkovalen, karena ikatan antar sub unit mudah putus oleh penambahan SDS atau urea. Hasil analisis densitomer memperlihatkan bahwa *silicatein* α merupakan bagian terbesar yaitu sekitar 70% dengan perbandingan *silicatein* α , *silicatein* β dan *silicatein* γ = 12:6:1 [4].

Penelitian selanjutnya, menunjukkan bahwa protein ini secara *in vitro* mampu mengkatalisis reaksi kondensasi dan polimerisasi silika dari substrat *tetraethoxyorthosilicate* dan *siloxane* pada pH netral, tekanan normal dan suhu kamar [6]. Walaupun belum diketahui mekanisme polimerisasinya secara pasti, diduga cara kerja protein ini mirip dengan mekanisme kerja protein pada golongan *serine protease*, karena asam amino pada sisi aktif dari protein ini adalah serin.

Kemampuan *sponge* dalam membentuk struktur padat silika mulai dari skala kecil (nano) dengan morfologi yang teratur dan spesifik merupakan hasil pengontrolan secara genetik. Mekanisme pengontrolan pembentukan biosilika ini sangat menarik para peneliti, tetapi masih belum banyak terungkap. Hal menarik lainnya adalah pada sistem biologis *sponge*, pembentukan biosilika berlangsung pada suhu ruang dan pH netral. Di industri, proses kondensasi prekursor silika menjadi struktur dengan pola dan morfologi yang spesifik memerlukan kondisi pH dan suhu ekstrim disertai penambahan surfaktan yang dapat mencemari lingkungan [7]. Selain itu, pembuatan silika di industri memerlukan waktu preparasi dan reaksi yang lama, dan sulit untuk dilakukan dalam proses kontinu.

Isolasi protein yang terlibat dalam pembentukan biosilika ini membuka peluang penggunaan katalis protein untuk membuat struktur silika yang spesifik dan teratur secara *in vitro*. Penggunaan protein sebagai katalis dapat meminimumkan kondisi reaksi ekstrim, mempersingkat waktu reaksi dan aman untuk lingkungan. Hasil penelitian ini sangat diperlukan untuk industri-industri strategis yang memproduksi semikonduktor, biosensor, *biochips*, *filter agent*, pengemas makanan, kit analisis dan lain-lain. Oleh karena itu, isolasi protein yang terlibat dalam pembentukan biosilika pada berbagai *sponge* laut

Indonesia beserta karakterisasinya sangat penting dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi protein sejenis *silicatein* yang dapat mengkatalisis polimerisasi silika dari beberapa sampel *sponge* asal perairan Pulau Nias, Lombok, Manado dan Binuangeun. Selanjutnya menguji aktivitas protein dalam melakukan polimerisasi silika secara *in vitro* dengan menggunakan substrat *tetraethoxyorthosilicate* (TEOS)

METODE PERCOBAAN

Isolasi Silika *Spikula* dan Protein *Silicatein* dari *Sponge*

Isolasi silika *spikula* dilakukan dengan menggunakan metode sebelumnya [4]. Metode ini berdasarkan pada pemisahan silika *spikula* yang tidak larut asam dari komponen lainnya. Pertama kali, *sponge* dibersihkan dengan air laut, dipotong dengan ukuran 1 cm³, *dibleaching* dengan perendaman dalam larutan hipoklorit jenuh. Potongan tersebut dicuci dengan air bebas ion, dibersihkan dengan air \pm 10 kali dan direndam dalam larutan HNO₃:H₂SO₄ 3 N (1:4) semalam. Endapan dibilas dengan air bebas ion beberapa kali sampai pH diatas 6.

Silika *spikula* yang telah diisolasi di atas direndam dalam bufer HF 2 M /NH₄F 8 M (pH 5,0) sambil diaduk untuk melarutkan silika, sampai tidak terlihat adanya endapan. Untuk menghilangkan bufer HF, larutan ini didialisis dalam air bebas ion bersuhu 4 °C selama 36 jam (air bebas ion diganti 9 kali). Dialisat disentrifugasi pada 6.000 xg selama 40 menit pada 4 °C. Protein yang mengendap disuspensikan dalam air bebas ion atau bufer Tris-Cl pH 6,8 dan disimpan pada 10 °C.

Penentuan Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan menggunakan Metode Bradford (*dye-binding method*) [8]. Protein sebanyak 100 μ l yang direaksikan dengan 2 mL Bradford (Bradford stok : air = 1:19). Selanjutnya konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan persamaan linier dari kurva standar protein BSA (*Bovine Serum Albumin*).

Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

Penentuan Berat Molekul dengan Teknik SDS-PAGE

Berat molekul protein ditentukan dengan menggunakan SDS/PAGE [9]. Protein (10 μ L sampai dengan 15 μ L) disuspensikan dalam bufer sampel, diinkubasi pada 95 °C selama 1 menit, dan dilarikan dalam gel poliakrilamid 10% pada tegangan 100 V selama \pm 1 jam. Marker berat molekul LMW (*Low Molecular Weight*) dari Amersham Bioscience juga dilarikan dalam gel. Gel diwarnai dengan *silver staining* untuk melihat protein yang terpisah dan kemudian ditentukan berat molekul berdasarkan standar protein.

Reaksi Protein dengan Substrat TEOS

Sebanyak 0,25 mL suspensi protein dalam bufer Tris-HCl pH 6,8 (dengan konsentrasi tris sebesar 25 mM) direaksikan dengan *tetraethoxyorthosilicate* (TEOS, sebanyak 1 mL dengan konsentrasi 4,5 mmol/mL) sambil di-shaker pada suhu kamar selama 12 jam, selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan produk silika (sebagai endapan).

Analisis Hasil Reaksi dengan Colorimetric Molybdate Assay

Pelet dicuci minimal 3 kali dengan etanol kemudian disentrifugasi kembali. Pelet dilarutkan dalam 1 mL 1 M NaOH pada 85 °C hingga 95 °C selama 30 menit untuk menghitung jumlah residu TEOS yang terpolimerisasi. Larutan dibiarkan selama 24 jam untuk membiarkan terjadinya pelarutan silika. Penghitungan asam silikat yang dilepaskan dilakukan dengan *colorimetric molybdate assay* yang dimodifikasi dengan pelarut Brzezinski dan Nelson yang dapat mendeteksi $\text{Si}(\text{OH})_4$ sampai dengan 50 mM [10].

Colorimetric molybdate assay dilakukan dengan cara mereaksikan 0,2 mL sampel dengan 0,4 mL larutan ammonium molibdat, dan dicampurkan selama 10 menit. Setelah 10 menit, ditambahkan 0,6 mL *reduction reagent* (campuran metol sulfit, H_2SO_4 50%, asam oksalat jenuh dan air bebas ion), lalu divorteks. Setelah

2 jam, dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 810 nm.

Hasil reaksi diamati dalam mikroskop, dan dilakukan foto dengan JEOL JSM-5310LV *Scanning Electron Microscope* yang sebelumnya *dicoating* dengan JEOL JFC-1200 *Fine Coater*. Proses ini dilakukan di Laboratorium Material Science, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Indonesia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat Molekul Protein

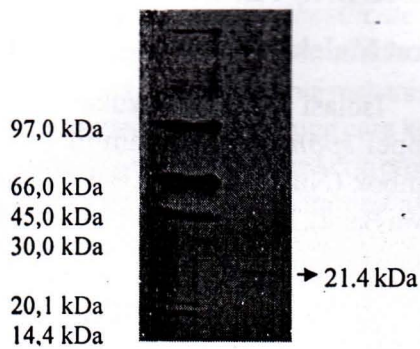
Isolasi protein dilakukan dari beberapa sampel *sponge* yang diambil dari perairan Lombok (Nusa Tenggara Barat), Binuangeun (Jawa Barat), Nias (Sumatera Utara) dan Manado (Sulawesi Utara). Protein berhasil diisolasi dari 7 sampel *sponge* dengan berat molekul bervariasi (Tabel 1). Secara umum, hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE ini memperlihatkan pita protein yang sangat jelas bebas dari kontaminan. Sebagai contoh hasil elektroforesis protein *Sponge* ST1 bersama marker berat molekul protein LMW pada Gambar 4. Protein dengan berat molekul antara 18 kDa hingga 27 kDa diduga merupakan protein sejenis *silicatein* yang mampu menjadi katalis dalam reaksi polimerisasi silika seperti yang ditemukan pada *sponge Tethya aurantia*.

Aktivitas Protein dalam Polimerisasi Silika

Aktivitas protein dari beberapa *sponge* tersebut dilihat dengan mereaksikannya dengan *tetraethoxyorthosilicate* (TEOS) selama 12 jam, pada suhu kamar. Untuk menentukan jumlah monomer TEOS yang dapat terpolimerisasi oleh aktivitas protein ini diperlukan kurva standar yang menghubungkan antara nilai absorbansi yang terukur melalui *colorimetric molybdate assay* dengan konsentrasi TEOS (Gambar 5). Kurva standar dibuat dengan menggunakan beberapa konsentrasi TEOS (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220 dan 225) nmol TEOS/mL DMSO. Kurva standar yang dibuat mempunyai persamaan linier $y=0,0009x+0,0623$; dengan nilai r^2 yang cukup tinggi sebesar 0,983 yang menunjukkan korelasi yang baik.

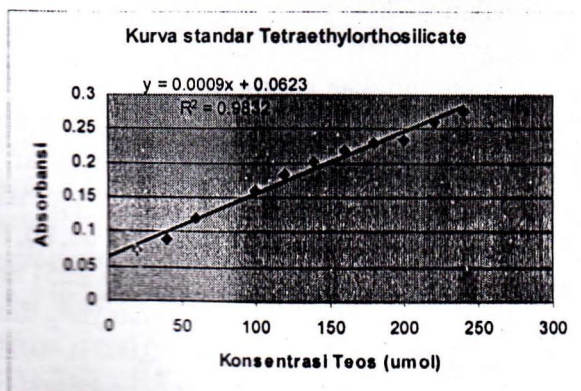
Tabel 1. Berat molekul protein.

No.	Protein dari Sponge	Asal Sponge	Berat molekul
1	37MT	Lombok	18.1 kDa
2	36MT	Lombok	15.5 kDa
3	5MT	Lombok	18.1 kDa
4	ST1	Binuangeun	21.4 kDa
5	ST3	Nias	21.4 kDa
6	N6	Nias	27.7, 23.3 kDa
7	M1	Manado	84, 37, 26.6, 18.1 and 16 kD



Gambar 4. Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE protein sponge ST1.

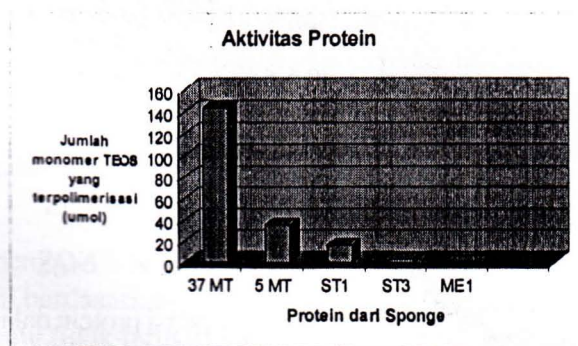
Aktivitas protein dalam melakukan polimerisasi TEOS ini bervariasi (Tabel 2). Aktivitas tertinggi terlihat pada protein dari Sponge 37MT yang dapat menghasilkan polimer silika dari 144,1 µmol monomer TEOS (Gambar 6). Sebagai perbandingan, [6] melakukan reaksi polimerisasi silika dengan menggunakan protein *silicatein* sub unit α dari *Sponge Tethya aurantia* yang dapat mempolimerisasi 210 nmol TEOS selama 15 menit. Dari uji aktivitas ini, menunjukkan bahwa protein tersebut mampu



Gambar 5. Kurva standar TEOS.

Tabel 2. Aktivitas protein dalam polimerisasi silika.

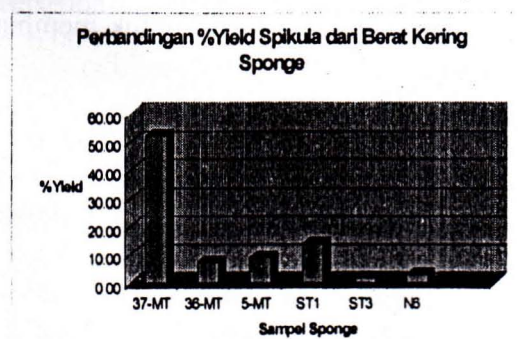
Protein dari sponge	Jumlah TEOS yang terpolimerisasi (µmol)
37MT	144.1
5MT	35.1
ST1	15.9
ST3	3
M1	0.9
Kontrol (tanpa protein)	0



Gambar 6. Aktivitas protein dalam polimerisasi silika.

menjadi katalis dalam reaksi polimerisasi silika dari substrat TEOS.

Besarnya aktivitas protein berdasarkan pengujian secara *in vitro* ini hampir mirip dengan besarnya aktivitas tersebut secara *in vivo* pada sponge itu sendiri. Hal ini dapat dilihat dari persentase jumlah (*yield*) silika spikula dari sponge terhadap berat kering sponge (Gambar 7). Di mana silika spikula yang terbentuk tersebut merupakan hasil dari aktivitas protein ini.

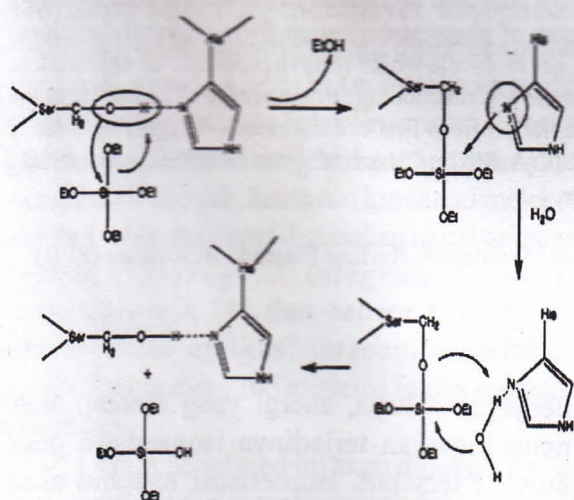


Gambar 7. Persentase yield silika spikula terhadap berat kering sponge.

Untuk menduga sisi aktif dari protein ini dilakukan uji penghambatan dengan senyawa

PSMF. Senyawa *PSMF* merupakan senyawa yang dapat menggantikan ion H pada gugus OH dari asam amino serin, sehingga protein dengan sisi aktif serin akan terhambat aktivitasnya. Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas protein ini terhambat dengan adanya senyawa *PSMF* yang ditambahkan dalam reaksi, sehingga diduga kuat sisi aktif protein ini adalah serin.

Mekanisme reaksi kondensasi dan polimerisasi TEOS oleh *silicatein* seperti pada Gambar 8 [6]. Mekanisme reaksi ini diambil berdasarkan model struktur tiga dimensi *silicatein* yang mirip dengan *protease* dengan sisi aktif yang Serin dan Histidin. Mekanisme reaksi diawali oleh atom N nukleofil pada gugus imidazole dari histidin menarik atom H dari gugus hidroksil serin, hal ini menyebabkan atom O bersifat reaktif dan memutuskan gugus etanol dari substrat TEOS. Proses ini disebut proses kondensasi substrat TEOS. Mekanisme polimerisasi secara detail belum diketahui, tetapi diduga proses ini dibantu oleh muatan positif pada gugus NH_3^+ yang mengarahkan pembentukan nuklei sebagai pusat agregasi partikel [11]. Konformasi protein secara keseluruhan diduga ikut membantu dalam proses pembentukan nanopartikel.



Gambar 8. Mekanisme reaksi serin protease.

KESIMPULAN

Protein yang diisolasi dari beberapa spesies *sponge* asal perairan Indonesia mempunyai berat molekul yang bervariasi. Berat molekul antara 18 kDa hingga 27 kDa diduga merupakan protein

sejenis *silicatein* yang mampu mengkatalisis reaksi polimerisasi silika. Aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh protein dari *Sponge* 37 MT (Lombok) yang mampu mempolimerisasi 144,1 μmol TEOS pada suhu kamar dan pH mendekati netral selama 12 jam.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Penelitian Fundamental DIKTI dan Universitas Atmajaya. Terimakasih juga kepada Departemen Kelautan dan Perikanan atas sampel *sponge*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. KOZZLOF E.N., *Invertebrates*. Saunders College Publishing, New York, (1990)
- [2]. BRUSCA R.C., BRUSCA G.J., *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. Publ., Sunderland, USA (1990)
- [3]. AIZENBERG J, SUNDAR VC, YABLON AD, WEAVER JC, CHENG G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**(10) (2005) 3358-3363
- [4]. SHIMIZU K., CHA J., STUCKY G.D., MORSE D.E., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** (11) (1998) 6234-6238
- [5]. POULSEN N., SUMPER M., KROGER N., *PNAS* **100** (21) (2003) 12075-12080
- [6]. CHA J.N., SHIMIZU K., ZHOU Y., CHRISTIANSEN S.C., CHMELKA B.F., STUCKY G.D., MORSE D.E., *Proc Natl Acad Sci.*, **96** (2) (1999) 361-365
- [7]. http://www.electronic.com.au/elc/feature_article/item_102001.asp. (2001)
- [8]. DUNN M.J., *Determination of Total Protein Concentration*. In : *Protein Purification Methods*. HARRIS EL and ANGAL S (Eds.). IRL Press, Oxford, England, (1989)
- [9]. LAEMMLI U.K., *Nature*, **227** (1970) 680-685
- [10]. BRZEZINSKI MA, NELSON DM., *J. Mater. Chem.*, **19** (1986) 139-151
- [11]. CORADIN T., LOPEZ P.J., *Chembiochem*, **3** (2003) 1-9