



Analisis Protein Gen LCYB pada Mikroalga Laut *Phaeodactylum tricornutum* menggunakan Pendekatan Bioinformatika

Murni Fitria^{a*}, Anggi Saputra^a, Rahmat Hidayat^a, Niken Feladita^a

^aJurusan Teknologi Pertanian, Politeknik Negeri Lampung

*corresponding author: murnifitria@polinela.ac.id

DOI : [10.20885/ijca.vol5.iss2.art8](https://doi.org/10.20885/ijca.vol5.iss2.art8)

ARTIKEL INFO

Diterima : 19 Agustus 2022
 Direvisi : 14 September 2022
 Diterbitkan : 23 September 2022
 Kata kunci : *Lycopene β-cyclase*,
 Diatom, Bioinformatika

ABSTRAK

LCYB merupakan gen yang memproduksi protein dalam bentuk enzim *lycopene β-cyclase* yang berperan dalam konversi likopen menjadi β-karoten. Gen ini terdapat pada diatom maupun mikroalga hijau. Penelitian ini dilakukan untuk memprediksi struktur protein gen LCYB pada diatom *P. tricornutum* menggunakan pendekatan bioinformatika. Hasil prediksi enzim *lycopene β-cyclase* pada diatom *P. tricornutum* dibandingkan dengan mikroalga hijau *M. zofingiensis*. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak MEGA7. Analisis *docking* dilakukan untuk mengidentifikasi interaksi antara enzim *lycopene β-cyclase* hasil prediksi dengan likopen sebagai ligannya. *P. tricornutum* memiliki kemiripan penanda genetik 18s rRNA terhadap *M. zofingiensis* sebesar 34,6%. Sementara itu, urutan asam amino dalam enzim *lycopene β-cyclase* hasil prediksi pada *P. tricornutum* dan *M. zofingiensis* memiliki kemiripan sebesar 31,9%. Enzim *lycopene β-cyclase* pada *P. tricornutum* hasil prediksi tidak memiliki heliks transmembran. Disamping itu, berdasarkan hasil analisis *docking* terlihat bahwa terdapat 5 interaksi antara enzim *lycopene β-cyclase* hasil prediksi dengan likopen yaitu 1 interaksi dengan Val94, 2 interaksi dengan Asp91, dan 2 interaksi dengan Leu93.

ARTICLE INFO

Received : 19 August 2022
 Revised : 14 September 2022
 Published : 23 September 2022
 Keywords : *Lycopene β-cyclase*,
 Diatom, Bioinformatic

ABSTRACT

LCYB is a gene that produces a protein called *lycopene β-cyclase* enzyme. It plays a role in *lycopene* conversion to β-carotene. This gene can be found in both diatom and green microalgae. This study was conducted to predict the LCYB gene's protein structure in *P. tricornutum* diatom using a bioinformatics approach. The result of the prediction of *lycopene β-cyclase* enzyme in *P. tricornutum* (diatom) is compared with that in *M. zofingiensis* (green microalgae). The phylogenetic tree construction was done using MEGA7 software. Docking analysis was carried out to identify the interaction between the predicted *lycopene β-cyclase* enzyme and *lycopene* as its ligand. The 18s rRNA genetic marker of *P. tricornutum* has a 34.6% similarity with *M. zofingiensis*. Meanwhile, the amino acid sequence in the predicted *lycopene β-cyclase* enzyme of *P. tricornutum* and *M. zofingiensis* has 31.9%

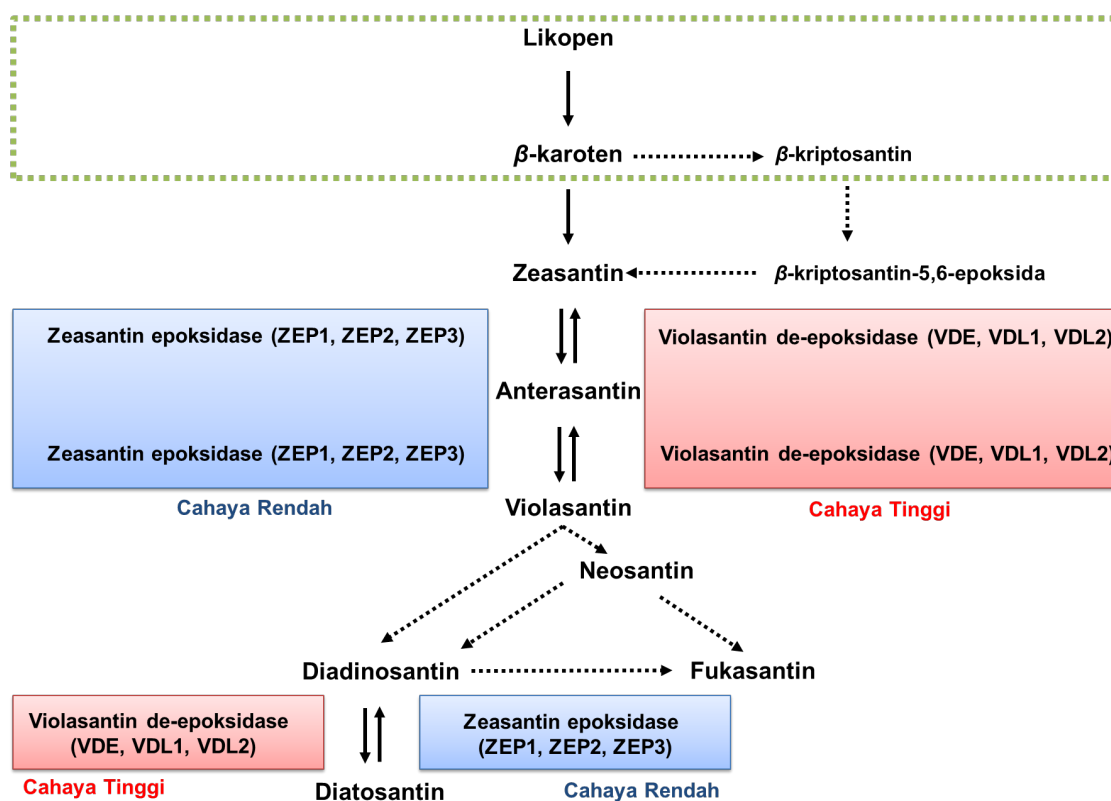


similarity. Therefore, the predicted lycopene β -cyclase enzyme of *P. tricorutum* did not have helix transmembrane protein. In addition, based on the results of the docking analysis, it can be seen that there are five interactions between the predicted lycopene β -cyclase enzyme and lycopene, namely one interaction with Val94, two interactions with Asp91, and two interactions with Leu93 in *P. tricorutum*.

1. PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan mikroorganisme fotosintetik golongan plankton. Beberapa kelas mikroalga diantaranya mikroalga hijau (*Chlorophyceae*) dan diatom (*Bacillariophyceae*). Perbedaan yang paling mencolok antara mikroalga hijau dan diatom adalah adanya cangkang yang tersusun dari silika pada diatom [1]. Pengendapan silika oleh diatom memungkinkan mereka untuk membuat struktur mikro atau nano yang bisa digunakan dalam pengobatan berbasis nano, terutama dalam pengiriman obat/gen. Diatom memiliki arsitektur yang unik, stabilitas termal yang baik, luas permukaan yang sesuai, prosedur fungsionalisasi/modifikasi kimia sederhana, kemudahan manipulasi genetik, optik/fotonik karakteristik, ketahanan mekanis, dan ramah lingkungan, sehingga dapat digunakan sebagai platform pengiriman pintar [2]. Diatom merupakan salah satu organisme autotrof karena mampu memanfaatkan cahaya matahari untuk mengubah karbondioksida dan air menjadi glukosa dan oksigen melalui fotosintesis [3]. Proses fotosintesis pada diatom terjadi di plastida yang disebut xantoplas. Proses fotosintesis tersebut tak terlepas dari pigmen-pigmen fotosintesis yang merupakan zat warna yang mampu mengabsorpsi cahaya tampak pada panjang gelombang tertentu dan memantulkannya pada panjang gelombang cahaya tampak yang berbeda. Pigmen fotosintesis yang paling umum terdapat pada xantoplas diatom adalah kelas klorofil dan karotenoid [4]. Karotenoid masuk ke dalam dua pigmen utama dalam diatom yang memiliki fungsi sebagai fotoproteksi dimana karotenoid ini memiliki aplikasi di berbagai industri, seperti kosmetik, *nutraceuticals*, makanan kesehatan, suplemen energi, dan pakan [5]. Salah satu jenis karotenoid yang umum adalah β -karoten yang merupakan *quencher* alami yang paling efisien, terlibat dalam pengikatan ROS, oksigen molekuler singlet, dan radikal peroksil, sehingga dapat mencegah peroksidasi lipid [6]. β -karoten telah dikonfirmasi memiliki aktivitas antikanker, yaitu kanker paru-paru, meskipun risiko kanker meningkat ketika dosis tinggi suplemen makanan kaya β -karoten dikonsumsi oleh perokok [7]. *Phaeodactylum tricorutum* merupakan spesies diatom laut yang telah banyak dipelajari dan merupakan diatom pertama yang sukses dilakukan rekayasa genetika [8] dan seluruh genomnya telah disequensing serta dianotasi [9].

P. tricorutum merupakan sumber karotenoid fukosantin masa depan yang potensial [10] yang memiliki manfaat sebagai antioksidan dan pigmenter pada bidang akuakultur [11]. Mengingat banyaknya manfaat karotenoid, maka penting untuk mempelajari hal-hal yang berperan dalam produksi karotenoid terutama enzim yang dihasilkan oleh sistem gen. Pada beberapa gen pengkode karotenoid, diatom memiliki jumlah gen ZEP, VDE, VDL, dan LTL lebih banyak dibandingkan mikroalga hijau *Chlamydomonas reinhardtii* maupun mikroalga merah [12]. Penelitian mengenai prediksi struktur 3D lycopene β -cyclase telah dilakukan sebelumnya. Hal tersebut dapat dilihat berdasarkan data pada UniProt. Terdapat prediksi struktur 3D lycopene β -cyclase pada mikroalga hijau diantaranya, *Chlamydomonas reinhardtii* (accession: Q4VKB6), *Chromochloris zofingiensis* (accession: D3UT43), dan *Auxenochlorella protothecoides* (sebelumnya dikenal sebagai *Chlorella protothecoides*) (accession: A0A087SGQ3). Telah terdapat pula prediksi struktur 3D pada diatom, yaitu *P. tricorutum* (accession: A0A5J6VE67 dan A0A385ZAR9) dan *Fistulifera solaris* (accession: A0A1Z5K641 dan A0A1Z5J8Z7). Akan tetapi, pemodelan hasil prediksi struktur 3D pada spesies yang telah disebutkan hanya dilakukan menggunakan satu perangkat bioinformatika saja, yaitu SWISS-Model, serta tidak dilakukan analisis protein transmembran analisis interaksi antara lycopene β -cyclase hasil prediksi dengan likopen. Oleh karena itu, studi ini dilakukan bertujuan untuk mengeksplorasi struktur produk gen LCYB (EC 5.5.1.19), yaitu lycopene β -cyclase pada diatom *P. tricorutum*.



Gambar 1. Jalur biosintesis β-karoten [13]

2. METODE

Urutan nukleotida gen LCYB diunduh dari NCBI dengan *accession number* MG397136.1 (*P. tricornutum*) dan FN563998.1 (*M. zofingiensis*). Pembuatan pohon filogenetik dilakukan menggunakan marker genetik 18s *rRNA* dengan memanfaatkan perangkat lunak MEGA7, penjejakan menggunakan ClustalW, dan konstruksi pohon menggunakan Maximum Likelihood dengan bootstrap 500. Prediksi gen dilakukan dengan mengunggah urutan nukleotida pada laman Softberry dan produk gen tersebut dikonfirmasi dengan mengunggah urutan asam amino pada laman ExpASY. Analisis kemiripan gen dan produk gen hasil prediksi dilakukan melalui penjejakan menggunakan EMBOSS Needle Selanjutnya prediksi produk gen dianalisis menggunakan tiga aplikasi prediksi protein yang berbeda, yaitu PredictProtein, SWISS-Model, dan Phyre² yang divisualisasikan menggunakan Firstglance in Jmol dan *software* VMD (*Visual Molecular Dynamics*). Analisis protein transmembran menggunakan PredictProtein, HMMTOP, dan Protter. Analisis sisi pengikatan enzim terhadap ligan menggunakan program 3DLigandSite, sedangkan *docking* menggunakan AutoDocksTools-1.5.6 dan visualisasi hasil *docking* menggunakan LigPlot⁺. Dalam analisis *docking*, *gridbox* ligan yang digunakan pada produk gen LCYB *P. tricornutum* adalah center_x = 11.232; center_y = -5.85; center_z = 39.311; size_x = 22; size_y = 36; size_z = 28, sedangkan *gridbox* ligan yang digunakan pada produk gen LCYB *M. zofingiensis* adalah center_x = -8.002; center_y = -30.441; center_z = 36.839; size_x = 16; size_y = 22; size_z = 8.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hubungan kekerabatan gen LCYB pada *P. tricornutum* dan *M. zofingiensis*

P. tricornutum memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dengan *M. zofingiensis* dibandingkan mikroalga kelas diatom referensi yang ditunjukkan Gambar 2. Meskipun demikian,

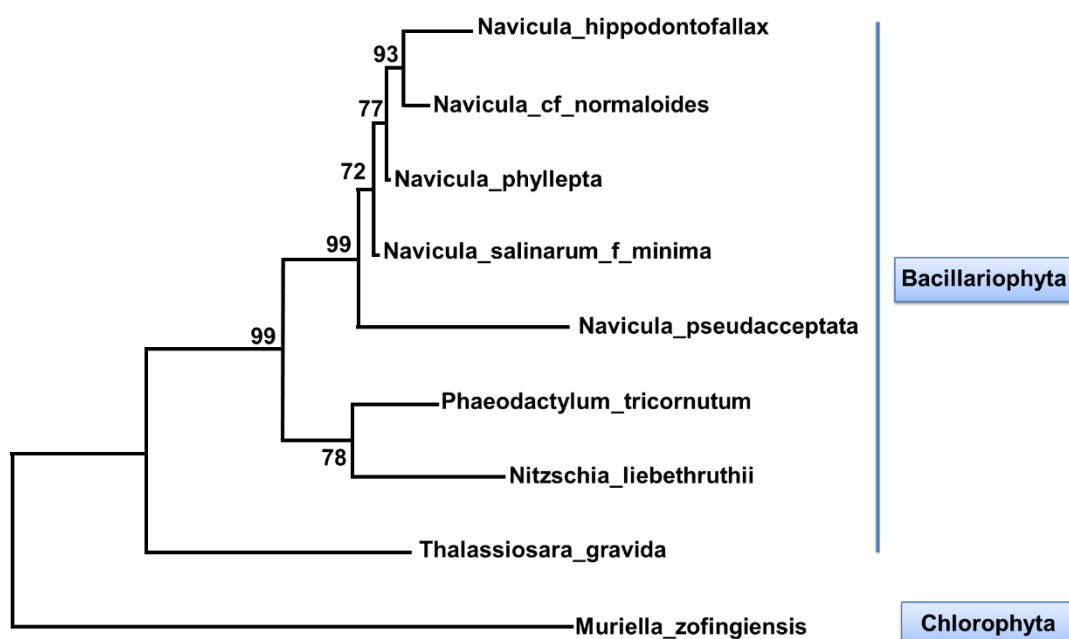
semua kelas rumput laut mengandung β -karoten dan jalur biosintetik β -karoten ditunjukkan Gambar 1 yang bersifat lestari [12].

3.2. Hasil prediksi produk gen LCYB

Berdasarkan hasil analisis menggunakan EMBOSS Needle (*pairwise alignment*), kemiripan gen LCYB *P. tricornutum* dan *M. Zofingiensis* adalah sebesar 34,6% dan kemiripan produk gen LCYB hasil prediksi sebesar 31,9%.

3.3. Analisis produk gen LYCB

Hasil analisis struktur protein menggunakan PredictProtein ditampilkan pada Gambar 3 menunjukkan bahwa produk gen LCYB pada *P. tricornutum* jauh berbeda dengan *M. zofingiensis*, yaitu pada *P. tricornutum* struktur sekunder heliks terdiri atas residu ke: 6-16; 21-23; 99-111; 141-155; 160-164; 197-217; 267-272; 362-375; 420-440; 447-480; 485-495; 499-507; 521-534; 537-546; 576-596; 634-642; 652-656, dan strand: 92-95; 117-122; 171-174; 223-226; 230-234; 240-244; 251-260; 284-292; 312-314; 336-340; 347-350; 404-408; 604-608; 615-618; sedangkan pada *M. zofingiensis*, struktur heliks pada residu ke-: 4-8; 37-50; 178-190; 225-229; 232; 234-255; 292-303; 305-309; 313-324; 328-335; 341-353; 357-366; 369; 371-378; 394-403; dan strand: 10; 14-18; 27; 33-36; 54-65; 69-74; 79-87; 109-116; 126-132; 151-157; 162-170; 199-204; 220-224; 230.

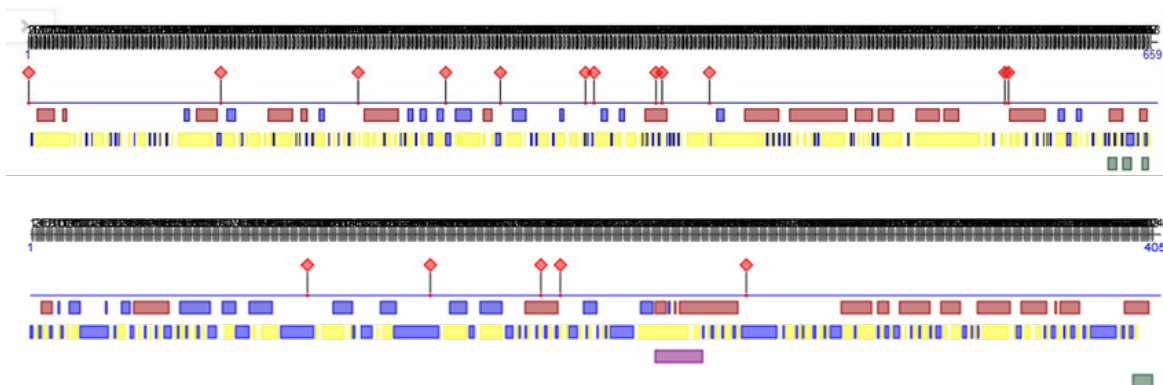


Gambar 2. Pohon filogenetik yang menunjukkan jarak kekerabatan *P. tricornutum* dengan *M. zofingiensis*

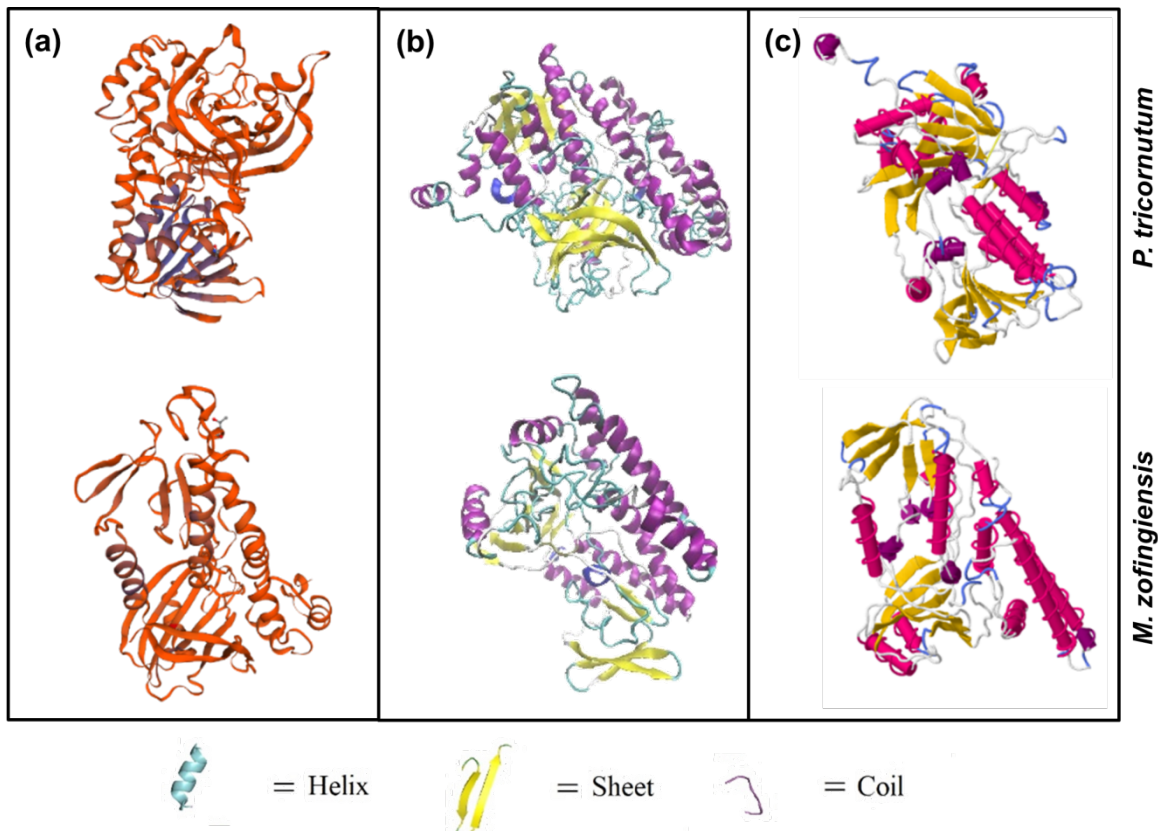
Pada Phyre² diperoleh prediksi protein dengan format PDB yang selanjutnya dapat dianalisis menggunakan Firstglance in Jmol dengan hasil pada *P. tricornutum*: 22.4% α -heliks (fanta), 4.8% 3_{10} heliks, 0% pi heliks (total heliks: 27.1%), β -strand 23.6% (ungu), turn 11.6% (kuning), dan random coil 37.7% (putih). Pada *M. zofingiensis*: 32.6% α -heliks, 4.2% 3_{10} heliks, 0% pi heliks (total heliks: 36.8%), β -strand 15.9%, turn 7.9%, dan random coil 39.4%.

Enzim bersifat spesifik, artinya enzim hanya bekerja pada substrat yang spesifik untuk membentuk produk yang spesifik juga. Substrat yang tepat akan masuk ke dalam situs aktif enzim dan membentuk kompleks enzim-substrat. Melalui proses tersebut, substrat ditransformasikan ke produk [14]. Setiap enzim diproduksi oleh gen atau disebut sebagai produk gen [15]. Produk gen LCYB hasil prediksi dianalisis sisi pengikatannya terhadap likopen selaku substratnya. Hasil prediksi sisi pengikatan produk gen LCYB hasil prediksi terhadap ligan (Gambar 5) menunjukkan

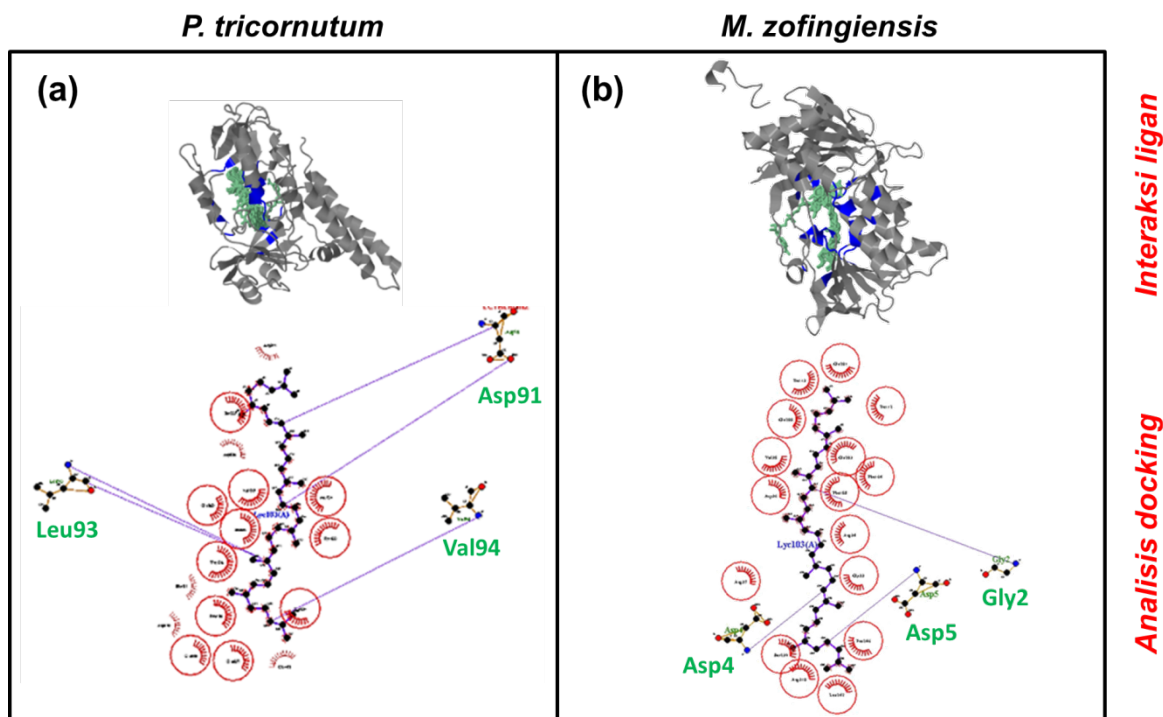
terdapat 32 residu yang berperan dalam sisi pengikatan ligan pada *P. tricornutum* dan 26 residu pada *M. zoofingiensis*, yaitu Arg34, Arg37, Lys41, Gly58, Lys59, Val60, Ala88, Thr89, Gly90, His91, Arg93, Lys94, Ala109, Glu166, Cys205, Leu206, Ile207, Gly225, Pro232, Gly235, Phe236, Met237, Val238, Ser239, dan Met 241 pada *M. zoofingiensis* dan Gly96, Gly98, Pro99, Ala100, Asp122, Gln 123, Pro130, Ala131, Asn132, Tyr133, Gly134, Glu139, Arg194, Arg201, Pro228, Cys261, Thr262, Gly263, His264, Lys267, Ala285, Glu350, Cys389, Gly408, Gly409, Pro416, Gly419, Tyr420, His421, Ile422, Cys423, dan Cys425 pada *P. tricornutum*. Hal tersebut dijadikan dasar untuk analisis docking untuk prediksi keberadaan interaksi antara likopen sebagai substrat dengan residu pada produk gen LCYB yang bukan merupakan hasil prediksi *3DLigandSite*.



Gambar 3. Prediksi struktur 2D protein produk gen LCYB pada (a) *P. tricornutum* dan (b) *M. zoofingiensis* menggunakan PredictProtein



Gambar 4. Prediksi struktur 3D protein produk gen LCYB pada *P. tricornutum* dan *M. zoofingiensis* menggunakan (a) SWISS-Model, (b) visualisasi struktur 3D protein hasil prediksi Phyre² menggunakan Firstglance in Jmol, dan (c) I-Tasser.



Gambar 5. (a) Analisis interaksi ligan dengan produk gen LCYB pada *P. tricornutum* (1) dan *M. zofingiensis* (2), serta (b) hasil analisis *docking* dengan likopen.

TABEL I. Hasil prediksi komposisi produk gen LCYB menggunakan PredictProtein, Phyre², I-Tasser, HMMTOP, dan Protter.

Spesies	PredictProtein		Phyre ²		I-Tasser		Protein transmembran		
	Heliks (%)	Strand (%)	Heliks (%)	Strand (%)	Heliks (%)	Strand (%)	HMM TOP	Predict Protein	Protter
<i>P. tricornutum</i>	33,69	10,47	27,1	23,6	23,67	16,99	1	-	-
<i>M. zofingiensis</i>	35,31	20	36,8	15,9	33,58	16,30	2	1	2

Hasil *docking* menunjukkan adanya interaksi antara likopen dan produk gen LCYB hasil prediksi (Gambar 5b), yaitu asam amino Asp91, Leu93, dan Val94 pada *P. tricornutum* dengan total 5 interaksi dan Gly2, Asp4 serta Asp5 pada *M. zofingiensis* dengan total 3 interaksi. Residu yang berinteraksi berdasarkan analisis *docking* berbeda dengan hasil prediksi menggunakan website *3DLigandsite* sebab *3DLigandsite* hanya dijadikan acuan *docking* saja. Selanjutnya, analisis struktur 2D protein gen LCYB hasil prediksi menggunakan PredictProtein menunjukkan adanya protein transmembran (Gambar 3b warna ungu) pada *M. Zofingiensis*. Oleh karena itu, analisis heliks transmembran dilakukan lebih lanjut (Tabel 1). Hasil analisis protein transmembran menunjukkan bahwa tidak terdapat heliks transmembran pada *P. tricornutum* sebagaimana terdapat pada *M. zofingiensis*. Sementara itu, berdasarkan jumlah ikatan likopen-produk gen LCYB hasil *docking*, dapat diketahui bahwa protein gen LCYB pada *P. tricornutum* lebih kuat mengikat likopen dibandingkan pada *M. zofingiensis*. Dampak dari jumlah ikatan tersebut perlu diteliti lebih lanjut kedepannya.

4. KESIMPULAN

Prediksi struktur molekul produk gen LCYB pada diatom *P. tricornutum* berhasil diperoleh melalui pendekatan bioinformatika. Perbedaan kekerabatan mikroalga hijau dan diatom menyebabkan hasil prediksi baik gen dan produk gen LCYB masing-masing berbeda signifikan lebih

dari 60%. Keberhasilan *docking* molekul gen LCYB dan produk diindikasikan dari adanya interaksi antara molekul tersebut dengan likopen sebagai ligannya. Di samping itu, hasil analisis menunjukkan bahwa kemiripan urutan asam amino produk gen LCYB pada pada *P. tricornutum* dan *M. zofingiensis* cukup jauh, dikarenakan dari hasil prediksi struktur 2D produk gen LCYB keduanya menunjukkan jumlah struktur heliks lebih banyak dibandingkan *betasheet*, akan tetapi hasil prediksi struktur secara 3D produk gen LCYB keduanya relatif mirip. Secara umum, produk gen LCYB dari keduanya sangat berbeda yaitu tidak adanya heliks transmembran pada produk gen LCYB *P. tricornutum* seperti pada *M. zofingiensis*.

Daftar Pustaka

- [1] R. Zah, C. Binder, S. Bringezu, J. Reinhard, A. Schmid, dan H. Schütz, *Future Perspective of 2nd Generation Biofuels*, Zürich: vdf, 2010.
- [2] N. Rabiee, M. Khatami, G.J. Soufi, Y. Fatahi, S. Irvani, dan R.S. Varma, "Diatoms with Invaluable Applications in Nanotechnology, Biotechnology, and Biomedicine: Recent Advances", vol. 7, pp. 3053–3068, 2021.
- [3] M.D. Kurkuri, C. Saunders, P.J. Collins, H. Pavic, dan D. Losic, "Combining micro and nanoscale structures: Emerging applications of Diatoms", *Micro Nanosyst.*, vol. 3, no. 4, pp. 277–283, 2011.
- [4] L. Margulis dan M.J. Chapman, *Kingdom and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, Cambridge: Academic Press, 2009.
- [5] R.K. Goswami, K. Agrawal, dan P. Verma, An Overview of Microalgal Carotenoids: Advances in the Production and Its Impact on Sustainable Development. In *Bioenergy Research*, New York : John Wiley & Sons, Ltd, 2021.
- [6] W. Stahl and H. Sies, "Bioactivity and protective effects of natural carotenoids", *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, vol. 1740, pp. 101–107, 2005
- [7] G.S. Omenn, G.E. Goodman, M.D. Thornquist, J. Balmes, M.R. Cullen, A. Glass, J.P. Keogh, F.L. Meyskens Jr, B. Valanis, J.H. Williams Jr, S. Barnhart, M.G. Cherniack, C.A. Brodtkin, dan S. Hammar, "Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy trial", *J Natl Cancer Inst.*, vol. 89, pp. 325–326, 1996.
- [8] L.A. Zaslavskaja, J.C. Lippmeier, C. Shih, D. Ehrhardt, A.R. Grossman, and K.E. Apt, "Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering", *Science*, vol. 292, pp. 2073–2075, 2001.
- [9] C. Bowler, A. Allen, J. Badger, dkk, "The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes", *Nature*, 456, 239–244, 2008.
- [10] A. Gómez-Loredo, J. Benavides, dan M. Rito-Palomares, "Growth kinetics and fucoxanthin production of Phaeodactylum tricornutum and Isochrysis galbana cultures at different light and agitation conditions", *J. Appl. Psychol.*, vol. 28, pp. 849–860, 2016.
- [11] A.R. Ribeiro, A. Gonçalves, M. Barbeiro, N. Bandarra, M.L. Nunes, M.L. Carvalho, J. Silva, J. Navalho, M.T. Dinis, T. Silva, dan J. Dias "Phaeodactylum tricornutum in finishing diets for gilthead seabream: effects on skin pigmentation, sensory properties and nutritional value", *J. Appl. Psychol.*, vol. 29, pp. 1945–1956, 2017.
- [12] K. Mikami dan M. Hosokawa, "Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, pp. 13763–13781, 2013.
- [13] P. Kuczynska, M. Jemiola-Rzeminska, dan K. Strzalka, "Review: Photosynthetic Pigments in Diatoms", *Mar. Drugs*, vol. 13, pp. 5847-5881, 2015.
- [14] A. Sumbono, *Enzim Seri Biokimia Pangan Dasar*, Yogyakarta: CV Budi Utama, 2021.
- [15] B. Irawan, *Karsinologi dengan Penjelasan Deskriptif dan Fungsional*, Surabaya: Airlangga University Press, 2013.