

Studi Proteomik pada Protein Otot Rangka *Rattus norvegicus* Menggunakan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi

Alvina Nur Aini

Program Studi Penjaminan Mutu Industri Pangan, Politeknik AKA Bogor, Bogor 16154, Indonesia

*E-mail: alvinaakabogor@gmail.com

(Received : 30 Mei 2022; Accepted: 24 Agustus 2022; Published: 26 Agustus 2022)

Abstrak

Analisis proteomik bertujuan untuk memperoleh informasi mengenai ekspresi protein seluler. Oleh karena fungsi penting protein dalam organisme hidup, proteomik memainkan peran penting dalam memahami sistem dan proses biologi. Metode paling umum untuk identifikasi protein dalam proteomik adalah menggunakan *Mass Spectrometry* (MS). Secara lebih spesifik, instrumen MS yang digunakan dalam analisis proteomik adalah Spektrometri Massa Resolusi Tinggi, yang mampu menganalisis massa eksak suatu ion molekuler. Dalam penelitian ini dilakukan hidrolisis sampel protein otot rangka *Rattus norvegicus* dengan menggunakan enzim tripsin untuk mendapatkan gambaran mengenai proses analisis proteomik. Hidrolisis protein dilakukan dengan variasi enzim:substrat 1:25 (b/b). Hasil hidrolisis kemudian diidentifikasi dengan menggunakan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi. Berdasarkan hasil analisis, terdapat 219 protein yang teridentifikasi. Hasil fragmentasi setiap peptida protein menunjukkan kesesuaian dengan fragmen teoritis secara *in silico*. Hal ini mengindikasikan bahwa identifikasi peptida menggunakan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi mampu memberikan hasil yang akurat, sehingga dapat menghindari keraguan dalam identifikasi protein yang kompleks. Hasil ini juga menunjukkan bahwa Spektrometri Massa Resolusi Tinggi memungkinkan *screening* target peptida dan identifikasi peptida dari matriks protein seluler.

Kata kunci : peptida; protein; proteomik; tripsin; spektrometri massa

Abstract

*Proteomic analysis aims to obtain the information about cellular proteins expression. Because of the important function of proteins in living organisms, proteomics plays an important role in understanding biological systems and processes. The most common method for identification and characterization of proteins in proteomics is the use of Mass Spectrometer (MS). More specifically, the MS instrument used in proteomic analysis is the High-Resolution Mass Spectrometry, which is capable to analyze the exact mass of molecular ions. In this study, the protein sample of *Rattus norvegicus* was hydrolyzed by using the trypsin enzyme to get an awareness of the proteomic analysis process. Protein hydrolysis was carried out with a variation of enzyme:substrate of 1:25 (w/w). The hydrolysis results were then identified using the High-Resolution Mass Spectrometry. Based on the results, there were 219 proteins could be identified. The results of fragmentation of each protein peptide showed conformity with the theoretical *in silico* fragment. This indicates that the identification of peptides using High-Resolution Mass Spectrometry is able to provide accurate results, avoiding doubts in the identification of complex peptides. These results also show that High-Resolution Mass Spectrometry allows the screening of target peptides and identification of peptides from highly complex protein matrices.*

Keywords: mass spectrometry; peptide; protein; proteomic; trypsin

PENDAHULUAN

Studi skala besar protein disebut dengan proteomik. Proteomik mengacu pada kajian ilmiah mengenai karakteristik seluruh protein yang diekspresikan dalam sel atau suatu jaringan pada kondisi tertentu. Tujuan dari pendekatan proteomik adalah memperoleh informasi tentang ekspresi protein seluler (Wilkins dkk., 1996).

Fungsi penting protein dalam organisme hidup menjadikan proteomik memegang peranan besar dalam memahami sistem dan proses biologi

(Kenyon dkk., 2002). Berbeda dengan genom yang bersifat statis, proteom bersifat sangat dinamis yang dipengaruhi oleh genom itu sendiri dan banyak faktor eksternal, seperti jenis jaringan, proses metabolisme, dan berbagai interaksi seluler.

Dalam beberapa tahun terakhir, bidang proteomik telah berkembang pesat. Proteomik telah diterapkan dalam berbagai sektor, seperti kedokteran, farmasi/obat-obatan, pertanian, dan pangan. Dalam bidang pangan, protein dapat berperan sebagai indikator ideal untuk mengetahui sifat makanan

terkait dengan kualitas makanan, komposisi, keamanan, maupun protein *marker* baru (Ortrea dkk., 2016).

Metode paling umum untuk identifikasi dan karakterisasi protein dalam proteomik adalah dengan menggunakan *Mass Spectrometer* (MS). Dari spektra MS yang dihasilkan, dapat diperoleh informasi tentang urutan peptida dan kelimpahannya. Langkah analisis proteomik dengan MS dapat dilakukan dengan dua pendekatan, yakni pendekatan *top-down* dan *bottom-up*. Pendekatan *top-down* dilakukan dengan mengkarakterisasi fragmen yang terbentuk dari disosiasi protein utuh secara langsung pada MS. Pendekatan ini tidak memerlukan hidrolisis enzimatik, tetapi memerlukan akurasi yang tinggi dari alat MS, sehingga penggunaannya terbatas (McLafferty dkk., 2007).

Pada pendekatan *bottom-up*, protein dihidrolisis terlebih dahulu secara enzimatik, umumnya menggunakan enzim tripsin. Peptida yang dihasilkan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan MS (Pandey dan Mann, 2000). Identifikasi protein melalui pendekatan *bottom-up* dilakukan dengan melihat pola fragmentasi massa dari MS. Pola *fingerprint* massa dapat dibandingkan dengan perkiraan massa hasil hidrolisis *in silico* berdasarkan urutan yang ada di *database* protein, sehingga didapatkan identitas protein (Domon dan Aebersold, 2006).

Dalam analisis proteomik, pada umumnya digunakan spektrometri massa dengan resolusi tinggi (*High-Resolution MS*). Peralatan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi mampu menentukan massa molekuler suatu senyawa secara tepat. Tergantung dari atom yang terkandung dalam suatu molekul, dimungkinkan bahwa suatu molekul dengan massa nominal sama memiliki sedikit perbedaan massa terukur ketika pengukuran presisi dilakukan. Jika pengukuran massa eksak terhadap rumus molekul yang massa nominalnya sama menggunakan massa isotop yang paling umum untuk tiap unsur, maka perbedaan massa diantara rumus molekul akan muncul pada angka kedua dan ketiga desimal. Suatu instrumen *Low-Resolution MS* tidak akan mampu membedakan rumus molekul tersebut. Spektrometri Massa Resolusi Tinggi tidak hanya menentukan massa eksak suatu ion molekuler, tetapi juga memungkinkan untuk mengetahui rumus molekul eksak. Umumnya, instrumen ini dapat menentukan suatu nilai m/z ion sampai empat atau lima angka desimal. Ketika massa diukur dalam tingkat ketepatan ini, hanya ada satu rumus molekul yang akan cocok dengan data (Pavia dkk., 2009). Hal ini menjadikan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi sangat berguna dalam analisis proteomik karena sampel protein bersifat sangat kompleks.

Di sisi lain, langkah kunci dalam preparasi sampel untuk proteomik adalah konversi protein menjadi peptida dengan mengoptimalkan preparasi serta metode LC-MS yang sesuai dengan protein

spesifik. Hidrolisis protein dengan protease adalah salah satu langkah utama di dalam proteomik (Steen dan Mann, 2004). Tripsin adalah enzim yang populer digunakan untuk reaksi ini. Enzim tripsin menghidrolisis ikatan peptida pada ujung peptida karbonil arginin (Arg/R) atau lisin (Lys/K), sehingga menghasilkan fragmen peptida dengan ujung C (C-terminal) arginin atau lisin. Hidrolisis dengan tripsin berlangsung pada pH optimal 7,5-8,5 dan umumnya dilakukan pada suhu 37 °C (Kapteyn dkk., 2006).

Dengan cakupannya yang luas, analisis proteomik merupakan potensi besar yang harus dikembangkan untuk mempelajari protein seluler. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan studi hidrolisis protein dengan sampel otot rangka *Rattus norvegicus* menggunakan enzim tripsin untuk mendapatkan gambaran mengenai proses analisis proteomik.

Rattus norvegicus merupakan hewan mamalia yang paling umum digunakan sebagai hewan percobaan laboratorium. *Rattus norvegicus* banyak digunakan sebagai hewan uji karena beberapa alasan, diantaranya mempunyai respon yang cepat, dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia maupun hewan lain, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi, dan mudah dalam penanganan (Moriwaki dan Shiroishi, 1994).

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ultimate 3000 Rapid Separation Ultra High Performance Liquid Chromatography* yang terhubung dengan *Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer* (Thermo Scientific), peralatan gelas laboratorium, tabung mikro 1,5 mL, tabung konikal 15 mL steril, mikropipet 10-1000 μ L (Socorex), *centrifuge* High Speed Sigma Sartorius 3-30K (Sigma), *centrifuge* Sorvall Biofuge Primo R (Thermo Scientific), *deep freezer* -80 °C (Thermo Scientific), timbangan elektrik (Denver AA-250), *vortex* (MX-S IKA), dan *shaker mixer* (RATEK Instrument). *Software* yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Xcalibur dan Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan otot rangka *Rattus norvegicus* galur Wistar, *sequencing grade modified trypsin* dan ditiotreitol dari Promega, Tris base dan Tris HCl dari Merck Millipore, iodoasetamida, amonium bikarbonat, aseton, dan asetonitril LC-MS grade dari Merck, serta *ultrapure distilled water* dari INVITROGEN.

Hidrolisis enzimatis protein

Proses hidrolisis protein didahului dengan purifikasi protein menggunakan aseton dingin. Sebanyak 200 μ L supernatan protein dipindahkan

pada tabung mikro dan diendapkan dengan 1000 μL aseton dingin ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pelet protein diendapkan melalui sentrifugasi. Pelet protein dilarutkan dalam 500 μL amonium bikarbonat 50 mM (pH 8,5) dan dihomogenkan dengan *vortex* hingga larut. Sebanyak 100 μg protein direduksi dengan 2 mM ditiotreitol selama 60 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, protein dialkisasi dengan 5 mM iodoasetamida selama 30 menit pada keadaan gelap.

Sebanyak 2 μg *sequencing grade modified trypsin* (perbandingan E:S 1:25 (b/b)) ditambahkan ke dalam sampel dan reaksi enzimatik dibiarkan berlangsung selama 24 jam pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sampel diencerkan dengan *ultrapure distilled water*:asetonitril 95:5 (v/v), kemudian disaring dengan *syringe filter* nilon 0,22 μm . Replikasi hidrolisis dilakukan sebanyak 3 kali.

Analisis protein dengan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi

Sebelum dianalisis dengan MS, peptida dipisahkan dengan *Ultimate 3000 Rapid Separation Ultra High-Performance Liquid Chromatography*. Sebanyak 5 μL sampel diinjeksikan ke dalam kolom Acclaim® PepMap RSLC C18 (75 $\mu\text{m}\times 150\text{ mm}$). Peptida pada kolom dielusi secara gradien menggunakan dua fase gerak, yakni fase gerak A yang berisi air dan 0,1% asam format dan fase gerak B yang berisi air:asetonitril 2:8 (v/v) dan 0,08% asam format, dengan laju alir 0,3 μL menit⁻¹.

Analisis MS dilakukan dengan *Q-Exactive Orbitrap Mass Spectrometer*. Untuk MS¹ dan MS² dilakukan dengan metode pengionan *Nanospray Ionization* (NSI). Deteksi MS menggunakan mode ion positif yang dioperasikan dengan mode *high resolution and accurate mass* (HRAM). Untuk analisis MS² digunakan rentang m/z 200-2000. Analisis dilakukan selama 90 menit. Kromatogram diperoleh dari *software* Xcalibur yang terhubung pada instrumen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hidrolisis protein

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* galur Wistar, dengan jenis kelamin jantan, usia 3 bulan, dan berbobot 200 gram. Hewan uji diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit IV Universitas Gadjah Mada dan seluruh prosedur perlakuan hewan telah mendapatkan sertifikat Kelayakan Etik dengan nomor 00058/04/LPPT/2018. Jaringan otot rangka *Rattus norvegicus* diambil dan dilakukan ekstraksi protein.

Analisis proteomik dengan MS dilakukan dengan analisis peptida (Steen dan Mann, 2004). Untuk mendapatkan peptida, maka protein terlebih dahulu dihidrolisis menggunakan suatu enzim yang dapat memotong protein menjadi peptida. Tripsin adalah enzim yang digunakan dalam penelitian ini. Sebelum dilakukan hidrolisis dengan tripsin, protein

dipurifikasi dengan menggunakan aseton dingin. Sampel protein pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang dapat mengganggu analisis, seperti garam-garam, asam nukleat, lipida, dan lain-lain (Antonioli, 2009). Purifikasi protein bertujuan untuk membuang kontaminan dan memekatkan protein dalam bentuk pelet/endapan, sehingga dapat dilarutkan dalam pelarut lain yang kompatibel dengan hidrolisis protein (Simpson dan Beynon, 2010).

Pelet protein selanjutnya dilarutkan ke dalam larutan 0,05 M amonium bikarbonat. Amonium bikarbonat adalah garam volatil yang terurai menjadi amonia, karbon dioksida, dan air. Karena volatil, garam ini kompatibel dengan MS. Larutan amonium bikarbonat 0,05 M memiliki rentang pH 7-9, yang merupakan pH optimum untuk aktivitas tripsin.

Setelah dilakukan purifikasi, sampel protein dihidrolisis untuk menghasilkan peptida. Sebelum dilakukan reaksi enzimatik, reaksi didahului dengan reduksi gugus disulfida sistein dan dilanjutkan alkilasi. Protein merupakan kumpulan polipeptida yang memiliki struktur tiga dimensi, yang saling melipat membentuk globular besar. Pelipatan protein terjadi karena adanya ikatan disulfida antar residu sistein. Dalam banyak kasus, jika protein tidak terbuka (*unfolded*) dengan benar sebelum penambahan enzim protease, enzim tidak akan secara efisien memecah protein. Oleh karena itu, interpretasi data MS akan sulit karena beberapa peptida hasil kesalahan pemotongan (*miscleavage*) akan muncul dan menghasilkan beberapa nilai m/z . Peptida yang sulit terionisasi tidak akan terdeteksi, yang menyebabkan cakupan urutan protein yang lebih rendah. Kehadiran ikatan disulfida di banyak struktur pelipatan protein membuat peneliti berfokus pada upaya untuk mereduksi dan mengalkilasi protein. Reduksi dan alkilasi dapat dilakukan dengan reagen ditiotreitol (DTT) dan iodoasetamida (IAA) (Rebecchi dkk., 2011)

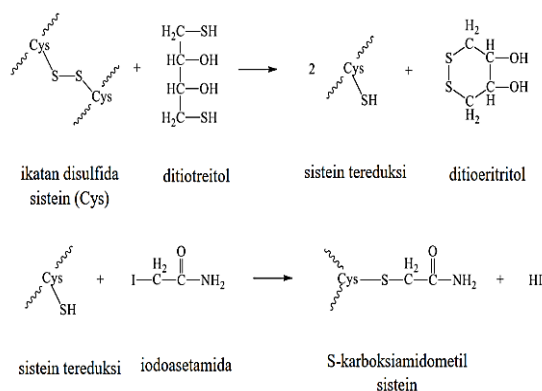
Ditiotreitol adalah agen pereduksi yang mengubah ikatan disulfida sistein menjadi gugus sulfhidril bebas, sehingga reagen ini berfungsi untuk memutus ikatan disulfida protein, sedangkan iodoasetamida adalah agen alkilasi yang bereaksi dengan gugus sulfhidril bebas dari sistein membentuk S-karboksiamidometil sistein, yang tidak dapat dioksidasi kembali membentuk ikatan disulfida. Reaksi dapat dilihat pada Gambar 1. Menurut Rebecchi dkk. (2011), langkah-langkah tersebut sangat penting untuk memberikan akses maksimum tripsin terhadap protein, sehingga pemotongan terjadi secara maksimal. Dengan hilangnya ikatan disulfida protein, maka struktur protein menjadi terbuka dan dapat bereaksi dengan enzim tripsin secara maksimum.

Protein kemudian dihidrolisis dengan enzim tripsin. Hidrolisis protein dengan protease adalah salah satu langkah kunci di dalam proteomik. Parameter hidrolisis dapat divariasikan secara sistematis untuk memantau efeknya terhadap kecepatan dan

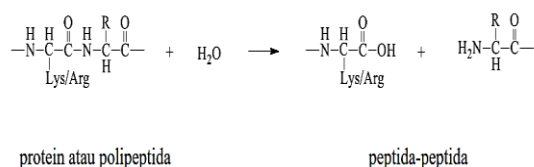
kesempurnaan hidrolisis. Informasi tentang rasio enzim:substrat (E:S) sangat diperlukan untuk memastikan jumlah enzim cukup untuk melakukan hidrolisis, tetapi tidak terlalu tinggi yang mengakibatkan produk autolisis dari tripsin itu sendiri (Hustoft dkk., 2012). Rasio E:S antara 1:100 sampai 1:10 (b/b) adalah rasio yang direkomendasikan untuk hidrolisis protein (Smith, 2002; Wierenga dkk., 2002; Suder dkk., 2004; Kapteyn dkk., 2006; dan Silva dkk., 2006). Optimasi dapat dilakukan dengan variasi rasio tersebut, dimana setiap jenis protein dapat memiliki rasio optimumnya masing-masing.

Orduna dkk. (2017) melakukan hidrolisis protein daging menggunakan rasio E:S 1:50 (b/b), sedangkan Alfiraza (2018) melakukan hidrolisis protein gelatin menggunakan rasio E:S 1:25 (b/b). Pada penelitian ini, optimasi dilakukan pada variasi E:S 1:25 (b/b). Pemilihan rasio tersebut karena merupakan rasio yang tidak terlalu kecil sehingga diharapkan jumlah peptida yang dihasilkan banyak dan juga tidak terlalu besar sehingga menyebabkan autolisis dari tripsin itu sendiri.

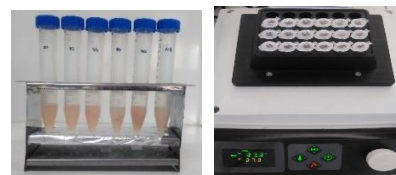
Enzim tripsin bekerja secara spesifik dengan menghidrolisis ikatan peptida pada ujung peptida karbonil arginin (Arg/R) atau lisin (Lys/K), sehingga menghasilkan fragmen peptida dengan ujung C (C-terminal) arginin atau lisin. Tahap reaksi dan proses hidrolisis protein dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 1. Reaksi pada ikatan disulfida sistein (Cys) dengan DTT dan IAA.



Gambar 2. Reaksi hidrolisis protein dengan enzim tripsin.



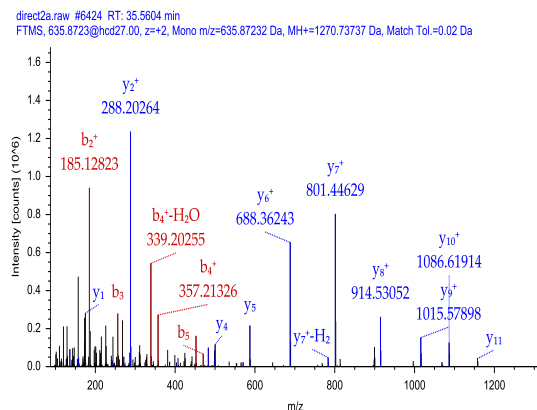
Gambar 3. Proses hidrolisis protein secara enzimatis.

Analisis MS

Setelah dilakukan pemisahan peptida menggunakan *Liquid Chromatography*, selanjutnya peptida diionisasi dan difragmentasi menggunakan MS. *Mass Spectrometry* mengukur rasio massa terhadap muatan ion untuk mengidentifikasi molekul dalam campuran sederhana ataupun kompleks. MS telah menjadi alat yang digunakan di berbagai aplikasi termasuk proteomik. Dalam analisis proteomik, pada umumnya digunakan spektrometri massa dengan resolusi tinggi (*High-Resolution MS*). Peralatan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi mampu menentukan massa molekul suatu senyawa secara tepat.

Metode MS dengan dua kali analisis massa disebut *tandem MS*, MS/MS, atau MS². Kombinasi MS¹ (tahap 1) dan MS² (tahap 2) yang terdapat pada Spektrometri Massa Resolusi Tinggi memungkinkan *screening target* dan identifikasi peptida. Sampel diinjeksikan ke MS, diionisasi, dipercepat, dan dianalisis dengan MS. Ion-ion dari spektra MS¹ kemudian difragmentasi secara selektif dan dipisahkan berdasarkan masing-masing rasio *m/z* dalam tahap kedua (MS²) untuk menghasilkan spektra fragmen ion (Weisser dan Choudhary, 2017). Berdasarkan hasil analisis MS, terdapat 219 protein yang berhasil teridentifikasi dari sampel jaringan otot rangka *Rattus norvegicus* (data ditampilkan pada *File Tambahan*).

Salah satu protein yang teridentifikasi oleh MS adalah aspartat aminotransferase mitokondrial dengan nomor asesi P00507. Protein ini merupakan protein yang terlibat dalam proses metabolisme asam amino. Jumlah peptida yang teridentifikasi adalah 8. Salah satu peptida protein ini yaitu IAATILTSPDLR. Peptida ini merupakan peptida pada posisi ke-326 sampai 337 dari urutan asam-asam amino protein aspartat aminotransferase mitokondrial (Gasteiger dkk., 2003). Peptida IAATILTSPDLR teridentifikasi dari fragmentasi MS² dengan *m/z* 635,87232, [M-H]⁺=1270,73737 Da ([M-H]⁺_{teoritis}=1270,73657 Da), dan z=+2. Spektra fragmentasi MS² ditunjukkan pada Gambar 4, sedangkan pola fragmentasinya ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 4. Spektra fragmentasi MS² peptida IAATILTSPDLR protein aspartat aminotransferase mitokondrial.

Fragmen ion peptida IAATILTSPDLR yang terkonfirmasi dalam MS² adalah y_1^+ ; $y_1^+-NH_3$; y_1^{2+} ; y_2^+ ; $y_2^+-NH_3$; $y_2^{2+}-NH_3$; y_3^+ ; $y_3^+-NH_3$; y_4^+ ; $y_4^+-NH_3$; $y_4^{2+}-NH_3$; y_5^+ ; $y_5^+-NH_3$; y_6^+ ; y_7^+ ; $y_7^+-NH_3$; $y_7^+-H_2O$; y_8^+ ; y_9^+ ; $y_9^{2+}-H_2O$; y_{10}^+ ; $y_{10}^+-H_2O$; y_{11}^+ ; b_2^+ ; b_3^+ ; b_4^+ ; $b_4^+-H_2O$; b_5^+ ; $b_5^+-H_2O$; $b_6^+-H_2O$ dan $b_{10}^{2+}-H_2O$.

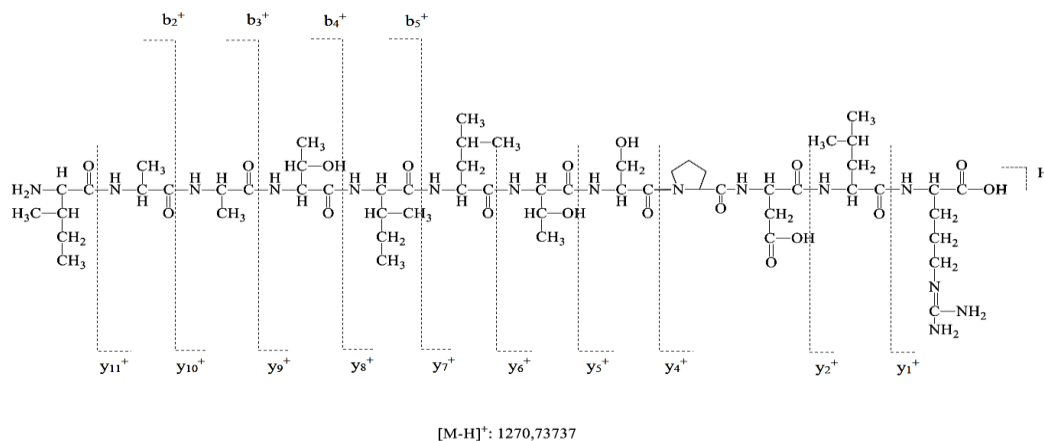
Untuk mengetahui informasi struktural dari MS, molekul bermuatan harus melalui proses

fragmentasi. Menurut nomenklatur Roepstroff-Fohlmann-Biemann, pemutusan ikatan terjadi pada ikatan paling lemah, yakni ikatan amida. Pemutusan ikatan ini menghasilkan ion b^+ atau y^+ . Ion b^+ terjadi apabila muatan berada pada fragmen yang mempunyai ujung amina (N-terminal), sedangkan ion y^+ terjadi apabila muatan berada pada fragmen yang mempunyai ujung karboksil (C-terminal) (Steen dan Mann, 2004). Pada penelitian ini, pola fragmentasi menghasilkan ion b^+ dan y^+ , dimana ion ini dapat pula merupakan ion yang kehilangan NH_3 atau H_2O . Sebagai perbandingan, fragmen teoritis peptida IAATILTSPDLR ditunjukkan pada Tabel 1.

Selain protein aspartat aminotransferase mitokondrial, terdapat protein beta-enolase yang juga teridentifikasi dengan nomor asesi P15429. Protein beta-enolase merupakan protein yang terlibat dalam proses metabolisme glukosa dan respon stimulus. Jumlah peptida yang teridentifikasi sebanyak 41. Peptida TLGPALLEK merupakan salah satu peptida yang teridentifikasi dari protein tersebut. Menurut database peptida pada website expasy.org (Gasteiger dkk., 2003), peptida ini berada pada posisi ke-72 hingga 80 dari urutan asam-asam amino yang membangun protein beta-enolase.

Tabel 1. Fragmen teoritis ion b^+ dan y^+ peptida IAATILTSPDLR (<http://db.systemsbiology.net/>)

Nomor	b^+	Sekuen	y^+	Nomor
1	114,09139	I	1270,73657	12
2	185,12850	A	1157,65251	11
3	256,16561	A	1086,61539	10
4	357,21329	T	1015,57828	9
5	470,29735	I	914,53060	8
6	583,38141	L	801,44654	7
7	684,42910	T	688,36247	6
8	771,46112	S	587,31479	5
9	868,51389	P	500,28277	4
10	983,54083	D	403,23000	3
11	1096,62489	L	288,20306	2
12	1252,72600	R	175,11900	1

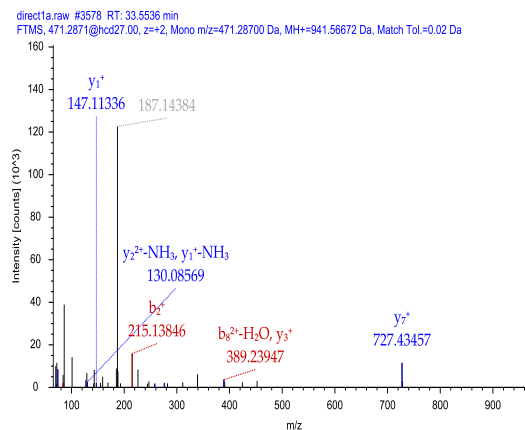


Gambar 5. Pola pemotongan peptida IAATILTSPDLR berdasarkan hasil spektra MS²

Peptida TLGPALLEK teridentifikasi dari fragmentasi MS² dengan m/z 471,28700, $[M-H]^+=941,56672$ Da ($[M-H]^+_{\text{teoritis}}=941,56661$ Da), dan $z=+2$. Spektra fragmentasi MS² ditunjukkan pada Gambar 6, sedangkan pola fragmentasinya ditampilkan pada Gambar 7. Fragmen ion peptida TLGPALLEK yang terkonfirmasi dalam MS² adalah y_1^+ ; $y_1^+-NH_3$; y_1^{2+} ; y_2^{2+} ; $y_2^{2+}-NH_3$; $y_2^{2+}-H_2O$; y_3^+ ; y_7^+ ; $b_1^+-H_2O$; b_2^+ dan $b_8^{2+}-H_2O$. Sebagai perbandingan, fragmen teoritis peptida tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.

Berdasarkan perbandingan, hasil fragmentasi peptida-peptida dan fragmen teoritis *in silico* bersesuaian satu sama lain. Kesesuaian ini dapat dilihat hingga 3 angka di belakang koma. Hal ini mengindikasikan bahwa identifikasi peptida menggunakan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi mampu memberikan hasil yang akurat, sehingga dapat menghindari keraguan dalam identifikasi peptida. Hasil ini juga menunjukkan bahwa Spektrometri Massa Resolusi Tinggi yang mengkombinasikan dua tahap analisis massa (MS¹ dan MS²) memungkinkan *screening* target dan identifikasi peptida dari

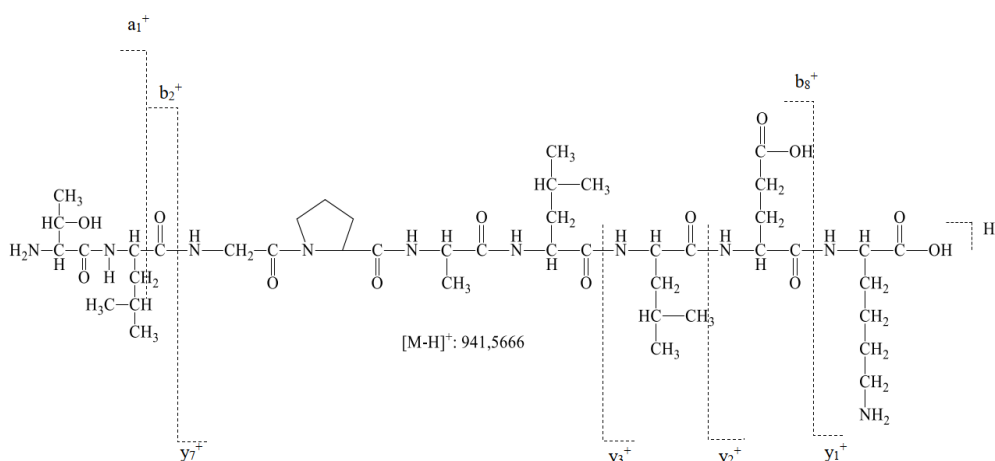
matriks protein yang sangat kompleks, sehingga sangat membantu dalam studi protein. Dalam penelitian ini, penggunaan enzim tripsin dapat secara spesifik menghidrolisis ikatan peptida pada ujung peptida karbonil arginin (Arg/R) atau lisin (Lys/K), sehingga menghasilkan fragmen peptida dengan ujung C (C-terminal) arginin atau lisin.



Gambar 6. Spektra fragmentasi MS² peptida TLGPALLEK protein beta-enolase

Tabel 2. Fragmen teoritis ion b^+ dan y^+ peptida TLGPALLEK (<http://db.systemsbiology.net/>)

No	b^+	Sekuen	y^+	No
1	102,05500	T	941,56665	
2	215,13906	L	840,51897	8
3	272,16053	G	727,43491	7
4	369,21329	P	670,41391	6
5	440,25040	A	573,36068	5
6	553,33447	L	502,32357	4
7	666,41853	L	389,23951	3
8	795,46112	E	276,15544	2
9	923,55609	K	147,11285	1



Gambar 7. Pola pemotongan peptida TLGPALLEK berdasarkan hasil spektra MS²

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini, analisis proteomik dilakukan terhadap otot rangka *Rattus norvegicus*. Hidrolisis protein menggunakan tripsin bertujuan untuk mengkonversi protein menjadi peptida. Identifikasi protein dilakukan dengan melihat pola fragmentasi peptida yang dihasilkan oleh Spektrometri Massa Resolusi Tinggi. Berdasarkan hasil analisis MS, terdapat 219 protein yang berhasil teridentifikasi dari sampel jaringan otot rangka *Rattus norvegicus*. Hasil fragmentasi peptida menunjukkan kesesuaian dengan fragmen teoritis secara *in silico*, sehingga analisis proteomik dengan Spektrometri Massa Resolusi Tinggi memungkinkan *screening* target peptida dan identifikasi peptida dari matriks protein yang sangat kompleks, serta sangat membantu dalam studi protein seluler.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfiraza, E.N. (2018). Identifikasi Peptida Spesifik pada Gelatin Babi Menggunakan *Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)*, Tesis, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis, *Sciences*, 312, 212-217.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The Proteomics Server for In-Depth Protein Knowledge and Analysis, *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.
- <http://db.systemsbiology.net/>, diakses pada 20 Mei 2022.
- Hustoft, H.K., Malerod, H., Wilson, S.R., Reubsæet, L., Lundanes, E. and Greibrokk, T. (2012). *A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics, Integrative Proteomics*, Rijeka: InTech.
- Kapteyn, J.C., Saidi, M.D., Dijkstra, R., Kars, C., Tjon, J.C., Weverling, G.J., de Vocht, M. L., Kompier, R., van Montfort, B. A., Guichoux, J-Y., Goudsmit, J., & Lagerwerf, F. M. (2006). Haemagglutinin Quantification and Identification of Influenza A&B Strains Propagated in PER.C6(R) Cells: A Novel RP-HPLC Method, *Vaccine*, 24, 3137-3144.
- Kenyon, G.L., DeMarini, D.M., Fuchs, E., Galas, D.J., Kirsch, J.F., Leyh, T.S., Moos, W.H., Petsko, G.A., Ringe, D., Rubin, G.M., & Sheahan, L.C. (2002). Defining the Mandate of Proteomics in the Post-Genomics Era: Workshop Report, *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 763-780.
- McLafferty, F.W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Jiang, H., Kong, X., & Begley, T.P. (2007). Top-Down MS: a Forward Complement to the High Capabilities of Proteolysis Proteomics, *FEBS Journal*, 274, 6256-6268.
- Moriwaki, K.T., & Shiroishi, H.Y. (1994). *Genetic In Wild Mice, Its Application to Biomedical Research*, Tokyo: Karger.
- Orduna, A.R., Husby, E., Yang, C.T., Ghosh, D. and Beaudy, F. (2017). Detection of Meat Species Adulteration Using High-Resolution Mass Spectrometry and a Proteogenomics Strategy, *Food Additives & Contaminants*, 34.
- Ortrea, I., O'Connor, G., & Maquet, A. (2016). Review on Proteomics for Food Authentication, *Proteomics*, 147, 212-225.
- Pan, S., Zhang, H., Rush, J., Eng, J., Zhang, N., & Patterson, D. (2005). High-Throughput Proteome-Screening for Biomarker Detection, *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, 182-190.
- Pandey, A., & Mann, M. (2000) Proteomics to Study Genes and Genomes, *Nature*, 405, 837-846.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., & Vyvyan, J.A. (2009). *Introduction to Spectroscopy*, 4th Ed., Boston: Cengage Learning.
- Rebecchi, K.R., Go, E.P., Xu, L., Woodin, C.L., Mure, M., & Desaire, H. (2011). A General Protease Digestion Procedure for Optimal Protein Sequence Coverage and PTM Analysis of Recombinant Glycoproteins: Application to the Characterization of HLOXL2 Glycosylation, *Analytical Chemistry*, 83, 8484-8491.
- Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G-Z., Vissers, J.P.C., & Geromanos, S.J. (2006). Absolute Quantification of Proteins by LCMSE: A Virtue of Parallel MS Acquisition, *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 144-156.
- Smith, B.J. (2002). *Protein Sequencing Protocols*, Totowa: Humana.
- Steen, H., & Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing, *Molecular & Cellular Biology*, 5, 699-711.
- Suder, P., Bierczynska, A., Konig, S., & Silberring, J. (2004). Acid-Labile Surfactant Assists In-Solution Digestion of Proteins Resistant to Enzymatic

- Attack, *Rapid Communication Mass Spectrom*, 18, 822–824.
- Weisser, H. and Choudhary, J.S. (2017). Targeted Feature Detection for Data-Dependent Shotgun Proteomics, *Journal of Proteome Research*, 16, 2964-2974.
- Wierenga, S.K., Zocher, M.J., Mirus, M.M., Conrads, T.P., Goshe, M.B., & Veenstra, T.D. (2002). A Method to Evaluate Tryptic Digestion Efficiency for High-Throughput Proteome Analyses, *Rapid Communication Mass Spectrom*, 16, 1404–1408.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., & Sanchez, J.C. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis, *Biotechnology*, 14, 61-65.