

TINJAUAN PUSTAKA

Struktur dan Klasifikasi Metallothionein

Metallothionein pertama kali ditemukan pada tahun 1957 sebagai protein yang mengandung banyak sulfur dan mengikat cadmium (Cd) dari ginjal kuda (Vallee 1991), dan menunjukkan hubungan yang erat dengan beberapa ion logam lainnya seperti zink (Zn) dan cupper (Cu) (Kagi & Kojima 1987). Sejak itu, MT telah diidentifikasi hampir pada berbagai organisme yang berbeda termasuk tanaman, mamalia, fungi bahkan pada beberapa prokariot (Vallee 1991; Cobbett & Goldsbrough 2002; Coyle *et al.* 2002).

MT merupakan protein (polipeptida) yang mempunyai massa molekul yang kecil (4-8 kDa), dan sifat utamanya adalah mengandung 26-33% asam amino *cysteine* (Cys) serta tidak mempunyai asam amino aromatik atau *histidin* (Frankenne *et al.* 1980; Engel & Brouwer 1984; Bayne *et al.* 1985; Rand & Petrocelli 1985; Binz & Kagi 1999). MT adalah protein yang terkonservasi, yang ditemukan tidak hanya pada berbagai tingkat jaringan/organ (misalnya hati, ginjal, insang, testis, usus, otot, plasma, eritrosit, sel-sel epitelial dan urine) tetapi ditemukan juga pada sitoplasma dan nukleus (Cherian 1994b).

Sistem tata nama untuk klasifikasi MT, pertama kali digunakan pada tahun 1978 (Nordberg & Kojima 1979), dan diperbaharui kembali pada tahun 1999 (Binz & Kagi 1999) kedalam 15 famili dan beberapa subfamili (Tabel 1). Klasifikasi MT disusun berdasarkan komposisi asam amino, jumlah dan pembagian asam amino Cys didalam sekuen, similaritas dari sekuen dan hubungan filogenetik (Binz & Kagi 1999).

Berdasarkan hubungan struktural, protein MT dibagi menjadi tiga kelas utama yang juga berdasarkan susunan dari asam amino Cys didalam urutan sekuen (Fowler *et al.* 1987; Zhou *et al.* 1995). MT kelas I mengandung residu Cys yang berkelompok dekat N-terminal dan C-terminal. Dua kelompok ini dipisahkan oleh daerah bagian tengah kira-kira sekitar lebih kurang 40 residu tetapi tanpa residu Cys. Dalam kelas ini, MT kelas I telah dikarakterisasi dengan beberapa motif C-X-C dalam domain pada N-terminal dan karakteristik ini diwakili oleh MT mamalia (Munger & Lerch 1985; Binz & Kagi 1999).

Berbeda dengan MT kelas I, MT kelas II tidak hanya mempunyai motif Cys-X-Cys tapi juga Cys-Cys dan Cys-X-X-Cys. MT kelas II diwakili oleh protein EcMT dari gandum dimana residu Cys dikelompokkan kedalam tiga domain yang banyak mengandung Cys dan dipisahkan oleh 10-15 residu selain Cys (Lane *et al.* 1987; Zhou *et al.* 2005). MT kelas II merupakan

MT pertama pada tanaman yang diisolasi (Kagi 1991). Selain itu, MT kelas II juga telah diidentifikasi pada *cyanobacteria*, nematoda *Caenorhabditis elegans* dan kapang (Kagi 1991).

MT kelas III pertama kali diidentifikasi dan karakterisasi dari *Schizosaccharomyces pombe* dan disebut *cadystins* (Murasugi *et al.* 1981; Kondo *et al.* 1984). Polipeptida yang serupa dan disebut dengan fitokelatin, dipurifikasi dari kultur sel tanaman (Grill *et al.* 1985). *Cadystin* dan fitokelatin disintesis secara enzimatis oleh enzim *Phytochelatin synthase* dari *glutathione* dengan struktur umum *gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine* (Cobbett & Goldsbrough 2002).

Tabel 1 Klasifikasi MT kedalam famili dan subfamili (Binz & Kagi 1999)

No	Famili	Subfamili
1	Vertebrata	m1, m2, m3, m4, m, a, a1, a2, b, ba, t
2	Molusca	mo1, mo2, mog, mo
3	Crustacean	c1, c2, c
4	Echinodermata	e1, e2
5	Diptera	d1, d2
6	Nematoda	n1, n2
7	Ciliata	ci
8	Fungi-I	f1
9	Fungi-II	f2
10	Fungi-III	f3
11	Fungi-IV	f4
12	Fungi-V	f5
13	Fungi-VI	f6
14	Prokariot	Pr
15	Planta	p1, p2, p3, p2v, p21, pec

Klasifikasi MT juga dilakukan oleh Cobbett dan Goldsbrough (2002) yang membagi MT menjadi empat macam tipe yang juga berdasarkan pada komposisi urutan asam amino Cys, yaitu (1) MT tipe 1 yang tersusun atas enam motif Cys-X-Cys (-X- adalah asam amino selain sistein) yang terdistribusi secara seimbang pada dua terminal, (2) MT tipe 2 memiliki dua ujung N-terminal dan C-terminal yang kaya Cys, dengan komposisi motif Cys-Cys pada asam amino ketiga dan keempat dari sekuen asam aminonya. Selain itu, MT tipe 2 mempunyai motif Cys-Gly-Gly-Cys pada ujung N-terminal dan motif Cys-X-Cys pada ujung C-terminal.

(3) MT tipe 3 hanya terdiri dari empat asam amino Cys pada ujung N-terminal. Tiga Cys pertama membentuk motif Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys. Sedangkan Cys keempat membentuk motif tersendiri yaitu Gln-Cys-X-Lys- Lys-Gly. (4) MT tipe 4 memiliki tiga wilayah yang masing-masing memiliki 5 sampai 6 Cys yang biasanya membentuk motif Cys-X-Cys sehingga MT tipe 4 ini berbeda dari kelompok MT tanaman lainnya. MT tanaman memiliki daerah pemisah yang lebih panjang antara N-terminal dengan C-terminal, yaitu sekitar 20-40 asam amino selain Cys (Yu *et al.* 2000), dibandingkan dengan MT mamalia yang memiliki kemiripan yang tinggi dengan MT tanaman.

Metallothionein pada Tanaman

MT pada tanaman pertama kali diidentifikasi pada tahun 1987, yaitu EcMT (*Early cysteine* MT) pada embrio gandum (*Wheat*) (Lane *et al.* 1987). Saat ini, lebih dari 140 sekuens MT telah dicatat dari berbagai spesies tanaman (Guo *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2005), termasuk dari beberapa tanaman seperti kedelai (Kawashima *et al.* 1991), buncis (Evans *et al.* 1990), jagung (de Framond 1991), *Arabidopsis* (Zhou & Goldsbrough 1995), padi (Zhou *et al.* 2006), *Sambucus nigra* (Coupe *et al.* 1995), kopi (Moisyadi & Stiles 1995), tembakau dan alfalfa (Robinson *et al.* 1992).

Gen *Mt* telah diisolasi dari banyak jenis tanaman dan diekspresikan didalam berbagai jaringan maupun organ seperti pada akar, batang, daun, bunga, buah dan biji dari berbagai spesies tanaman yang berbeda. Analisis pola ekspresi dapat membantu untuk mengungkapkan kemungkinan fungsi biologi dari gen *Mt*. mRNA *Mt1* sebagian besar ditemukan di akar (Evans *et al.* 1990; de Framond 1991), *Mt2* pada daun (Zhou & Goldsbrough 1995; Hsieh *et al.* 1995; Foley & Singh 1994), sementara *Mt3/Mt4* kebanyakan dideteksi didalam pemasakan buah (Clendennen *et al.* 1997). Transkrip *Mt* pada buncis (*PsMt*) sebagian besar ditemukan didalam akar dibandingkan dengan yang ada pada daun dan benih (Evans *et al.* 1990). Gen *Mt* pada gandum (*EcMT*) dan padi (*OsMt-II-1a*) diekspresikan pada tahap perkembangan benih (Lane *et al.* 1987; Zhou *et al.* 2005), sedangkan *Mt* pada kedelai diekspresikan lebih kuat di daun daripada di akar (Kawashima *et al.* 1991).

Ekspresi gen *Mt* pada tanaman diregulasi oleh berbagai faktor termasuk ion-ion logam dan infeksi pathogen (Robinsons *et al.* 1993). Efek dari induksi berbagai faktor tersebut terhadap ekspresi MT tergantung pada spesies tanaman, jaringan dan tipe MT. Pada *Mimulus guttatus* (de Miranda 1990), kedelai (Kawashima *et al.* 1991) dan *barley* (Okumura *et al.* 1991), tingkat

mRNA MT berkurang dengan perlakuan Cu, sedangkan ekspresi MT pada *Vicia faba* (Foley & Singh 1994), dan *Nicotiana glutinosa* (Choi *et al.* 1996) diinduksi akibat pelukaan dan infeksi virus. Pada *Arabidopsis* (Zhou & Goldsbrough 1995; Murphy & Taiz 1995), gandum (Snowden & Gardner 1993), kacang kapri (Evans *et al.* 1990), dan padi (Hsieh *et al.* 1995), transkripsi *Mt* dapat meningkat oleh induksi dari beberapa jenis logam.

MT pada tanaman yang paling banyak dipelajari adalah pada *Arabidopsis* karena hanya tanaman ini yang memiliki lebih dari satu famili gen *Mt* yang telah diidentifikasi (Garcia-Hernandez *et al.* 1998). Analisis dari genom *Arabidopsis* yang telah selesai dilakukan, menunjukkan bahwa *Arabidopsis* mengandung famili gen *Mt* dengan tujuh gen *Mt* yang aktif (Guo *et al.* 2003). Ada tiga famili gen yang telah diisolasi yaitu *Mt1*, *Mt2*, dan *Mt3*, ketiganya homolog dengan gen *Mt* yang telah diidentifikasi dari spesies lain. Empat gen dari *Mt* (*Mt1a*, *Mt1c*, *Mt2a* dan *Mt2b*) ditranskripsikan pada *Arabidopsis* (Zhou & Goldsbrough 1995). Analisis *Southern blot* dan isolasi cDNA pada *Arabidopsis* dan spesies tanaman lainnya telah mengindikasikan bahwa gen *Mt* selalu ada sebagai famili gen pada tanaman (Giritch *et al.* 1998; Liu *et al.* 2002; Guo *et al.* 2003).

Famili gen *Mt* juga telah dianalisis pada padi (*OsMt*). Analisis yang menyeluruh dari sekuen genom padi menunjukkan ada 11 gen yang menyandikan *OsMt*, ini mengindikasikan bahwa *OsMt* merupakan famili gen kecil didalam genom padi. Ekspresi dari tiap gen dalam famili gen *OsMt* memperlihatkan perbedaan, tidak hanya pada sekuennya tetapi juga pada pola ekspresi dari jaringannya (Zhou *et al.* 2006).

cDNA *Mt* tipe I dan II telah diisolasi dari beberapa tanaman leguminosa seperti kedelai, kacang merah, *green gram*, *kidney bean*, *green peas* dan *broad bean*. cDNA *Mt* tipe I memiliki ukuran sekitar 530-550 pb termasuk 216-240 pb ORF (*open reading frame*) sedangkan cDNA *Mt* tipe II berukuran sekitar 540-570 pb dan 231-243 pb ORF. Kedua cDNA *Mt* tersebut menunjukkan karakteristik yang khas dari MT tipe I dan II yaitu terdapat susunan Cys pada setiap N-terminal dan C-terminal dari sekuen (Sun *et al.* 2004). Kawashima *et al.* (1991) berhasil mengisolasi klon cDNA dari pustaka kedelai yang memiliki ORF dengan 79 asam amino yang menyandikan MT. MT kedelai menunjukkan homologi yang signifikan dengan daerah yang terkonservasi pada N-terminal dan C-terminal dari *Neurospora crassa* dan sebagian besar MT mamalia.

Metallothionein dan Detoksifikasi Logam

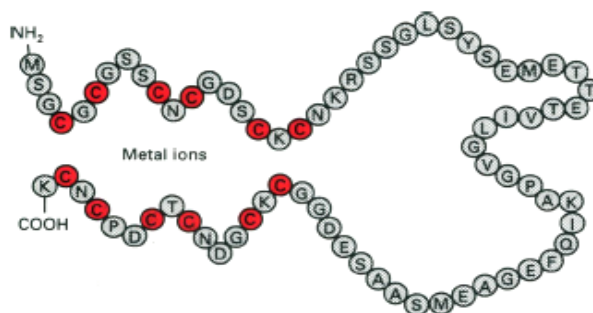
Ion logam biasanya terlibat dalam proses biologi yang kompleks, termasuk perannya sebagai kofaktor atau sebagai modulator didalam reaksi biokimia oksidasi dan reduksi. Sel perlu menyimpan cadangan logam tetapi tidak berlebihan atau pada konsentrasi toksik. Ion-ion logam tersebut selanjutnya dibebaskan secara perlahan sebagai fungsi keperluan sel (Carpene 1993).

Peningkatan konsentrasi dari logam-logam esensial dan non-esensial didalam tanah, dapat memacu terjadinya gejala keracunan dan terhambatnya pertumbuhan pada sejumlah besar tanaman (Hall 2001). Peranan MT didalam mekanisme detoksifikasi logam berkaitan dengan kemampuan MT dalam mengikat logam-logam yang dapat bersifat toksik seperti logam esensial (Cu^+ dan Zn^{2+}) dan logam non-esensial (Cd^{2+} dan Hg^{2+}) (Kagi & Kojima 1987).

MT juga digunakan sebagai indikator pencemaran karena kepekaan dan keakuratannya. Hal ini didasarkan pada suatu fenomena alam dimana logam-logam dapat tersekap di dalam jaringan tubuh organisme yang dimungkinkan karena adanya protein tersebut. Metallothionein merupakan protein pengikat logam (metal-binding protein) yang berfungsi dan berperan dalam proses pengikatan ataupun penyekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Noël-Lambot *et al.* 1978; Langston & Zhou 1986; Bebianno *et al.* 1993).

Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino Cys maka protein ini mengandung kelompok 'thiol' (sulfhydryl, -SH) dalam jumlah yang besar. Kelompok ini mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, mercury, cupper, dan cadmium. Residu sulfhydryl dari Cys mampu mengikat logam, dimana 1 ion logam (misalnya: Cd, Zn atau Hg) untuk 3 residu -SH, atau 1 ion logam dengan 2 residu -SH (Noël-Lambot & Bouquegneau 1977; Edwards & Hassall 1980; Engel & Brouwer 1989; Bebianno & Langston 1992 a, b; Manahan 1991, 1992). Koordinasi pengikatan dari setiap ion logam melalui sulfur yang ada pada Cys, membentuk struktur tetrahedral tetrathiolate (Schultze *et al.* 1988; Robbins *et al.* 1991).

MT mengandung banyak residu Cys yang dibutuhkan untuk mendetoksifikasi logam-logam berat dengan mengikat kation dari logam transisi (Kagi 1991). MT memiliki dua domain yang mempunyai peranan fungsional yaitu domain β (N-terminal) yang terlibat dalam homeostasis dari ion logam esensial, dan domain α (C-terminal) yang mengikat dengan kuat logam-logam toksik (Hamer 1986; Cherian *et al.* 1994a). Mekanisme kedua pengikatan ion logam oleh kedua domain tersebut telah diamati oleh Kille *et al.* (1991) pada asosiasi antara logam dengan PsMT_A (*Pisum sativum* MT_A), yang kemudian di ilustrasikan dalam bentuk model (Gambar 1).



Gambar 1 Model struktur pengikatan logam oleh PsMT_A (Kille *et al.* 1991)

MT mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan dengan protein lain juga dapat berlangsung dengan mudah. Kondisi ini disebabkan karena ikatan MT terhadap logam memiliki kestabilan termodinamik yang tinggi tetapi dengan stabilitas kinetik yang rendah (Zangger *et al.* 2001). Karena alasan ini, MT mempunyai fungsi biologis sebagai distributor dan mediator intraseluler terhadap logam-logam yang diikatnya (Kagi 1987).

Regulasi ion logam oleh gen *Mt* dilakukan melalui perantara yaitu suatu motif sekuen spesifik yang disebut MRE (metal responsive element), yang berada di daerah promoter. MRE mengikat faktor transkripsi dan menunjukkan peran esensial dalam respon terhadap logam berat, dan juga terlibat didalam perkembangan jaringan dan reaksi fisiologis. MRE telah dikarakterisasi dari manusia, tikus, *Drosophila* dan kapang (Palmiter 1998; Coyle *et al.* 2002; Haq *et al.* 2003).

Peranan Metallothionein dalam Berbagai Mekanisme Seluler

Sel bereaksi dengan berbagai respon homeostatik yang luas terhadap lingkungan yang mengalami cekaman akibat dari terjadinya perubahan fisiologis. Respon ini termasuk dengan mensintesis protein *heat shock*, *cytokine* dan metallothionein (Hamer 1986).

Sejumlah fungsi seluler untuk MT telah diajukan, termasuk meregulasi homeostasis logam esensial, perlindungan terhadap radiasi dan kerusakan oksidatif, kontribusi didalam kontrol seluler dari proliferasi dan apoptosis (Lazo *et al.* 1998; Klaassen *et al.* 1999). Simpkins (2000) menyatakan bahwa MT diketahui mengatur tiga proses fundamental: (1) melepaskan gas perantara seperti radikal hidroksil atau oksida nitrik; (2) apoptosis dan (3) pengikatan dan pertukaran dari logam berat seperti Zn, Cd atau Cu.

Akumulasi MT pada tingkat seluler tergantung pada ekspresi gen dan degradasi protein. Kedua mekanisme tersebut sebagian besar tergantung pada kemampuan MT untuk mengikat Zn. Ekspresi MT dihubungkan dengan akumulasi Zn didalam berbagai organ (Davis & Cousins 2000). MT memainkan peran penting dalam homeostasis Zn terutama pada pankreas, dimana

MT tidak hanya melindungi terhadap defisiensi Zn tetapi juga mencegah efek racun dari Zn pada pankreas (de Lisle *et al.* 1996).

Berbagai penelitian tentang peran MT telah menunjukkan bukti bahwa MT dapat berperan dalam sejumlah proses biokimia (Davis & Cousins 2000). MT dapat berperan dalam pelacakan Zn dan/atau mentransfer Zn ke apoprotein, termasuk karbonik anhidrase (Li *et al.* 1980), aldolase, alkalin phosphatase, themolisin (Udom & Brady 1980), piridoxal kinase (Churchich *et al.* 1989; Hao *et al.* 1993), reseptor estrogen (Cano-Gauci & Sarkar 1996), dan protein *zinc finger* (jari-jari zinc) yang berperan dalam pensinyalan seluler dan regulasi transkripsi (Davis & Cousins 2000).

Meningkatnya konsentrasi logam berat dapat menstimulasi terbentuknya formasi dari radikal bebas dan spesies oksigen reaktif yang menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif (Diezt *et al.* 1999). Kerusakan oksidatif tersebut direspon oleh sel dengan mensintesis protein dan antioksidan (Halliwell & Gutteridge 1990). MT adalah protein dari kelompok 'thiol' yang berfungsi sebagai antioksidan dalam sistem pertahanan oksidan secara non-enzimatik didalam mengatasi cekaman oksidatif (Goodyear 2002). Induksi gen *Mt* yang diakibatkan oleh cekaman oksidatif terjadi pada berbagai tipe sel. Overekspresi dari MT melindungi sel mamalia dan secara dramatis dapat mengurangi tingkat radikal oksigen dari intraseluler (Schwarz *et al.* 1994). Secara *in vitro*, MT merupakan pengambil radikal hidrosil yang efisien (Thornalley *et al.* 1985), ini diperlihatkan oleh adanya reaksi langsung dengan spesies oksigen reaktif termasuk radikal hidrosil dan hidrogen peroksida (Kang 1999). Peranan MT didalam mencegah kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh spesies oksigen reaktif, telah dikuatkan dengan penelitian pada embrio somatik (Mir *et al.* 2004).

MT dapat melindungi sel dari apoptosis yang diinduksi oleh logam dan cekaman oksidatif. MT adalah regulator potensial yang penting dalam proses apoptosis (Shimoda *et al.* 2003). Secara *in vitro*, ekspresi MT telah dihubungkan dengan pertahanan terhadap apoptosis yang diinduksi oleh doxorubicin didalam cardiomyocytes (Wang *et al.* 2001), logam dan cekaman oksidatif pada sel pigmen retinal (Lu *et al.* 2002), dan cisplatin pada sel embrio tikus (Kondo *et al.* 1997).

MT disintesis sebagai konsekuensi dari berbagai macam cekaman pada tingkat seluler, dan ditemukan baik pada intraseluler dan ekstraseluler. Pada tingkat intraseluler, MT dapat bertindak sebagai penyimpan logam-logam berat yang esensial, pengambil (scavenger) spesies oksigen reaktif dan regulator untuk aktifitas faktor transkripsi (Lynes *et al.* 2006)

Keberadaan MT pada tingkat ekstraseluler, memberi kontribusi dalam peran yang sangat penting, yaitu sebagai *danger signal* terhadap kerusakan yang dapat ditimbulkan pada tingkat seluler. MT ditemukan pada hasil sekresi dan ekskresi yang merupakan bagian dari jaringan ekstraseluler. MT ekstraseluler memiliki peran penting sebagai regulator dari berbagai fungsi seluler seperti pada perkembangan fungsi adaptif imunitas (Canpolat & Lynes 2001).

Dalam proses pengendalian terhadap kondisi stres, MT ditemukan didalam darah dengan konsentrasi yang meningkat (Armario *et al.* 1987). MT yang ditemukan dalam urine (metallothionuria) selalu digunakan sebagai indikator terhadap keracunan Cd (Tohyama *et al.* 1981; Tang *et al.* 1999). Selain itu, MT juga telah ditemukan didalam susu manusia (Milnerowicz *et al.* 2005), *bronchoalveolar* (Hart *et al.* 1986), cairan prostat (Suzuki *et al.* 1992), empedu (Bremner *et al.* 1987), saluran pankreas (de Lisle *et al.* 1996), *liver sinusoid* dan *renal tubules* (Danielson *et al.* 1982).

Metallothionein pada Organisme Lain

MT pada hewan termasuk juga manusia telah menjadi subjek dari penelitian yang intensif, terutama terhadap peranan MT didalam detoksifikasi logam, homeostasis dan proteksi terhadap kerusakan oksidatif (Sato & Bremner 1993; Cai *et al.* 1999; Coyle *et al.* 2002). Gen *Mt* hewan merespon terhadap faktor-faktor endogen, termasuk berbagai jenis hormon, *second messengers*, faktor pertumbuhan dan *cytokine* (Thornalley & Vasak 1985).

Daftar MT hewan yang telah dikarakterisasi meliputi cakupan spesies yang luas termasuk vertebrata, mollusca, crustacea, echinoderma dan nematoda. Seluruh MT dari spesies-spesies tersebut memiliki struktur dan fungsi yang hampir serupa, namun menunjukkan perbedaan yang signifikan pada pola Cys dalam sekuen nukleotida dan asam amino (Davis & Cousins 2000).

MT yang telah diidentifikasi pada hewan terdiri dari sekitar 60 asam amino dan mengandung 20 Cys yang mengikat ion-ion logam kedalam dua domain (Kagi 1991). Posisi residu Cys antar sekuen MT mamalia tidaklah berbeda, dan protein dari berbagai jenis filum (seperti pada *Neurospora crassa* dan *Agaricus bisporus*) memiliki similitas pada struktur utamanya dan digolongkan kedalam MT kelas I (Munger & Lerch 1985).

MT hewan diketahui memiliki empat isoform yaitu MT-1, MT-2, MT-3 dan MT-4. Isoform MT-1 dan MT-2 terdistribusi pada berbagai jaringan terutama pada hati, pankreas, intestin dan ginjal. Sedangkan MT-3 dan MT-4 ditemukan terutama pada otak dan kulit (Klaassen 1998; Vasak *et al.* 2000).

Sebagian besar MT invertebrata, seperti *Drosophila*, memiliki satu domain protein yang mengandung beberapa residu Cys. Ada dua gen *Mt* yang telah diketahui pada *Drosophila melanogaster*, yaitu *Mtn* (Lastowski-Perry *et al.* 1985) dan *Mto* (Mokdad *et al.* 1987). Protein *Mtn* terdiri dari 40 asam amino dan *Mto* terdiri dari 43 asam amino, dan kedua protein tersebut hanya memiliki 30 % asam amino yang identik .