

PENGARUH GLUKOSA DAN YEAST EXTRACT TERHADAP PRODUKSI INHIBITOR PROTEASE *Pseudomonas aeruginosa* DARI *Chromohalobacter* sp. 6A3 (BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS *Xetospongia testudinaria*)

INFLUENCE OF GLUCOSE AND YEAST EXTRACT TOWARD PRODUCTION OF *Pseudomonas aeruginosa*-Protease Inhibitor FROM *Chromohalobacter* sp. 6A3 (BACTERIA ASSOCIATED WITH SPONGE *Xetospongia testudinaria*)

Tati Nurhayati, Maggy Thenawidjaja, Lilis Nuraida, dan Sri Budiarti Poerwanto

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
E-mail : nurhayati7870@yahoo.com

ABSTRACT

One way to inhibit protease activity is search is compound which can inhibit the enzyme known as protease inhibitor. The bacteria associated with sponge Xetospongia testudinaria, Chromohalobacter sp. 6A3, as producer Pseudomonas aeruginosa-protease inhibitor. Because the compound is important, determination medium composition for producing is very important to be conducted. The purpose of this research was to determinate the glucose and yeast extract concentration accurately so protease inhibitor would be produced in a short time. The accurate medium composition for producing the protease inhibitor were 0.1%(w/v) yeast extract; 0.05% (w/v) glucose; 0.5%(w/v) special peptone; 0.2%(v/v) trace element; and 2%(w/v) NaCl at pH 7.

Keywords: Chromohalobacter sp., protease inhibitor, sponges.

PENDAHULUAN

Bakteri patogen, seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas* sp. dapat menyebabkan penyakit yang dikenal sebagai *foodborne diseases*. Berbagai cara digunakan oleh bakteri tersebut dalam menyebarkan penyakit, diantaranya menggunakan protease. Melalui enzim ini, bakteri dapat menembus lapisan protein sel inang sehingga penyakit dapat menyebar luas. Oleh karena itu, maka dalam dasawarsa terakhir ini perhatian terhadap protease sebagai target senyawa obat bagi penyakit asal bakteri (seperti pneumonia, kolera, *typhus*, *gonorrhoe*), virus (seperti influenza dan HIV), dan malaria serta kanker, bahkan penyakit degeneratif seperti *Alzheimer* meningkat pesat. Saat ini sudah banyak obat-obatan yang mekanisme kerjanya menghambat kerja protease. Namun peneliti terus melakukan penelitian untuk mencari inhibitor protease alami dari berbagai sumber, seperti bakteri, fungi, juga organisme laut seperti spons, tunicate dan lain-lain. Diantara organisme laut yang ada, spons merupakan penghasil komponen bioaktif terbanyak (Mayer dan Lehmann, 2000), termasuk di dalamnya senyawa inhibitor enzim (Lee *et al.*, 2001). Inhibitor protease yang alami diharapkan lebih aman bagi tubuh.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons juga menghasilkan komponen bioaktif (Webster *et al.*, 2001). Hal ini dimungkinkan mengingat jumlah antara koloni bakteri dan cyanobacteria yang ada di spons, terutama *Aplysina aerophoba*, bisa mencapai 40% dari biomasa spons (Alin *et al.*, 2003). Mikroorganisme tersebut membentuk suatu simbiotik dengan spons baik di dalam inti sel, di dalam sel, di dalam spons, dan di luar spons. Hubungan simbiotik ini bisa dilakukan mengingat spons merupakan hewan yang makan dengan cara menyaring makanan dan dikenal dengan istilah *filter*

feeder, dalam hal ini mikroorganisme dapat menjadi nutrisi bagi spons. Lee *et al.* (2001) melaporkan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis simbiotiknya sehingga dapat dimungkinkan bahwa spons mengandung komponen bioaktif yang sama dengan simbiotiknya. Sebagai contoh *Micrococcus* sp. menghasilkan komponen diketopiperazin, yang sebelumnya telah dilaporkan dihasilkan oleh spons inangnya yaitu *Tedania ignis* (Stierle *et al.*, 1988). Simbion bakteri yang lain, yaitu *Vibrio* sp. memproduksi bifenil eter bromina, yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu *Dysidea* sp. (Elyakov *et al.*, 1991). Simbiotik *Vibrio* sp. menghasilkan komponen bioaktif berupa peptida yang bersifat anti *Bacillus* yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu ekstrak spons *Hyatella* sp. (Oclarit *et al.*, 1994). Flowers *et al.* (1998) melaporkan bahwa simbion spons *Oscillatoria spongeliae*, mengandung senyawa diketopiperazin klorina yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu *Dysidea herbacea*. Singh *et al.* (2003) menyatakan bahwa *Pseudomonas* sp. F92S91 yang diisolasi dari spons laut di Fiji menghasilkan inhibitor yang terlibat dalam biosintesis asam lemak, yaitu α -piron. Senyawa tersebut ternyata juga berfungsi sebagai antibakteri. Nurhayati *et al.* (2006a) menyatakan bahwa simbion spons *Jaspis stellifera* menghasilkan inhibitor terhadap protease *Staphylococcus aureus*, simbion spons *Xetospongia testudinaria* (*Chromohalobacter* sp. 6A3) menghasilkan inhibitor protease *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan simbion spons *Plakortis nigra* menghasilkan inhibitor protease *Escherichia coli*. Diantara ketiga jenis simbion tersebut, aktivitas inhibitor protease yang dihasilkan oleh *Chromohalobacter* sp. 6A3 mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi (95,5%). Isolat dengan aktivitas penghambatan tertinggi digunakan pada penelitian selanjutnya.

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa komposisi media produksi berpengaruh terhadap

produksi inhibitor protease. Desniar *et al.* (2006) dan Nurhayati *et al.* (2006b) melaporkan bahwa konsentrasi pepton, yeast extract, NaCl, serta pH berpengaruh terhadap waktu produksi dan aktivitas inhibitor protease *E. coli* yang dihasilkan oleh simbiosis spons *Plakortis nigra*, yaitu *Acinetobacter baumannii*, serta kestabilan produksi inhibitor tersebut. Imada *et al.* (1985) melaporkan bahwa jenis dan konsentrasi pepton, glukosa, serta yeast extract berpengaruh terhadap produksi inhibitor protease yang dihasilkan oleh *Alteromonas* sp. Oleh karena itu dalam rangka mempercepat diproduksinya inhibitor tersebut dan juga untuk lebih meningkatkan aktivitas inhibitor protease dari *Chromohalobacter* sp. 6A3, maka perlu dilakukan modifikasi komposisi media produksi inhibitor tersebut.

METODE PENELITIAN

Bahan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Pseudomonas aeruginosa* sebagai penghasil protease yang diperoleh dari Rumah Sakit Pusat Pertamina, Jakarta dan *Chromohalobacter* sp. 6A3 sebagai penghasil inhibitor protease *P. aeruginosa*. Selain itu juga diperlukan bahan-bahan untuk media *marine broth* (*special peptone*, yeast extract, NaCl, glukosa, dan trace element) dan *bacto agar* dengan merk Oxoid, serta bahan kimia untuk analisis konsentrasi protein metode Bradford dan aktivitas inhibitor protease metode Imada *et al.* (2000) yang dimodifikasi.

Metode

Optimasi Media Produksi Inhibitor Protease

Optimasi dilakukan pada media *marine broth* yang ditambah dengan glukosa 0,1% (w/v) dan konsentrasi yeast extract yang bervariasi (0,1; 0,5; dan 1,0% w/v), dan pH media (7 dan 8) untuk isolat 6A3. Sebagai pembandingan digunakan media *marine broth* yang ditambah glukosa 0,05% (w/v). Selanjutnya dilakukan optimasi media pada media *marine broth* yang ditambah glukosa 0,05% (w/v) dengan konsentrasi yeast extract 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4% (w/v). Erlenmeyer 250 ml yang telah berisi 150 ml media *marine broth* yang dimodifikasi diinokulasikan dengan bakteri *Chromohalobacter* sp. 6A3 segar sebanyak 10%(v/v). Inokulum dikultivasi dalam *watershakerbath* pada suhu 30 °C, kecepatan 150 rpm selama 52 jam. Pengamatan dilakukan tiap 4 jam sekali. Sampel yang diambil disentrifugasi pada kecepatan 5,286 g selama 15 menit. Analisis meliputi OD ($\lambda=660$ nm), pH, konsentrasi protein (metode Bradford) diacu dalam Hammond dan Kruger (1988), dan aktivitas inhibitor protease (Imada *et al.*, 1985).

Analisis Aktivitas Inhibitor Protease (Imada *et al.*, 1985 yang dimodifikasi)

Protease sebagai substrat untuk analisis aktivitas inhibitor protease diproduksi dengan metode Baehaki *et al.* (2008). Prosedur pengukuran

inhibitor protease dilakukan sebagai berikut: campuran yang terdiri atas 0,5 ml protease dari bakteri patogen dan 0,5 ml larutan inhibitor dipreinkubasi pada 30 °C selama 12 menit. Kemudian, 1 ml kasein hammett 2%(w/v) dalam larutan bufer TrisCl 50 mM, pH 8 ditambahkan kedalamnya dan diinkubasi 12 menit pada suhu 30 °C. Setelah inkubasi, 2 ml TCA 5%(w/v) ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim, dan campuran disimpan selama 20 menit pada suhu 30 °C guna mengendapkan kasein yang tidak dicerna enzim. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, supernatan diukur pada absorbansi 280 nm. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus: $(1-B/A) \times C \times 100$. A merupakan peningkatan nilai optical density (OD) tanpa inhibitor setelah diinkubasi 12 menit, B merupakan peningkatan nilai OD dengan penambahan inhibitor setelah diinkubasi 12 menit, dan C merupakan faktor pengenceran. Satu unit inhibitor protease adalah jumlah inhibitor protease yang mampu menghambat aktivitas protease 0,05 U/mg protein sebanyak 50%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi komposisi media maupun kondisi produksi, dengan harapan inhibitor yang dihasilkan bukan hanya mempunyai aktivitas tinggi namun dapat pula dihasilkan dalam waktu yang lebih singkat dengan komposisi media yang lebih sederhana.

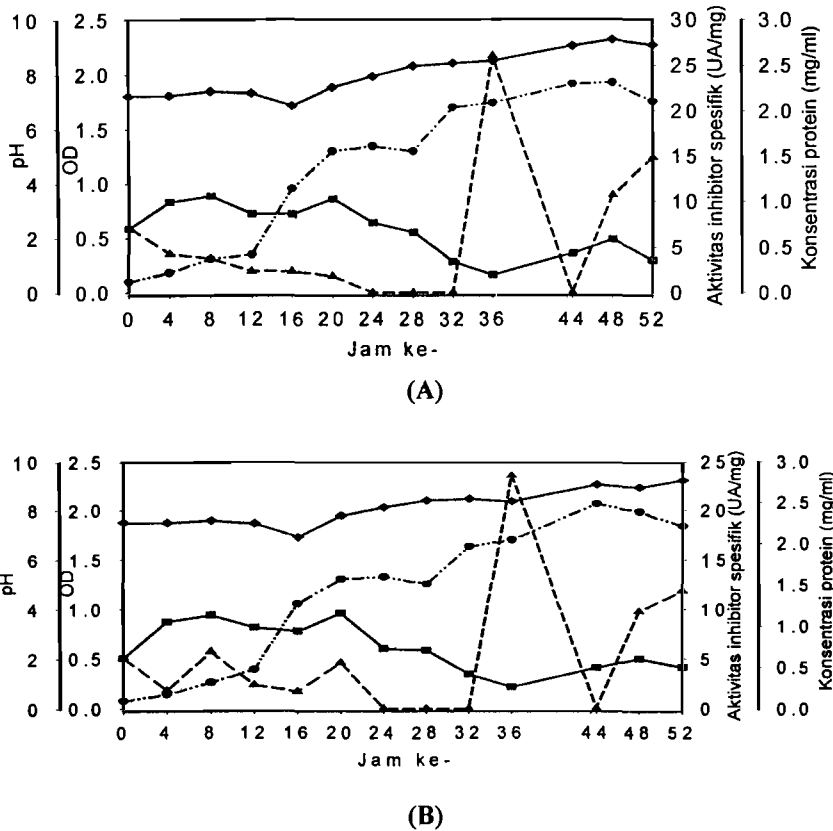
Beberapa perlakuan yang diberikan meliputi penambahan glukosa dengan konsentrasi 0,1% w/v (G01), special peptone 0,5% w/v, variasi yeast extract yaitu 1% w/v (kode 1); 0,5 w/v (kode 2 (YE0,5)); dan 0,1% w/v (kode 2), perlakuan pH 7 (kode 7) dan pH 8 (kode 8), serta konsentrasi NaCl yang digunakan 2% w/v (kode 2). Sebagai pembandingan digunakan media *marine broth* (konsentrasi yeast extract 0,2% w/v) yang ditambah glukosa 0,05% w/v. Variasi pH yang digunakan 7 dan 8, karena pH air laut asal spons diambil yaitu 7,6.

Pada media G01-172 (glukosa 0,1 % (w/v), yeast extract 1% (w/v)), dengan pH awal medium 7 inhibitor protease dari isolat 6A3 dihasilkan selama inkubasi 0-52 jam dengan nilai tertinggi (26,02 U/mg protein) pada fase menjelang stasioner (OD 1,74) setelah inkubasi 36 jam sebagaimana disajikan pada Gambar 1A. Pada kondisi tersebut pH media sekitar 8,5, sedangkan protein supernatannya adalah 0,198 mg/ml. Kondisi yang sama terjadi pada media yang sama, namun pH medium awal dinaikkan menjadi 8 (G01-182). Pada kondisi ini pun inhibitor protease dihasilkan selama waktu inkubasi 0-52 jam dengan aktivitas tertinggi (23,572 U/mg protein) pada fase menjelang stasioner (OD 1,70) setelah inkubasi selama 36 jam sebagaimana disajikan pada Gambar 1B. Pada saat ini pH media 8,36 dan konsentrasi protein 0,264 mg/ml.

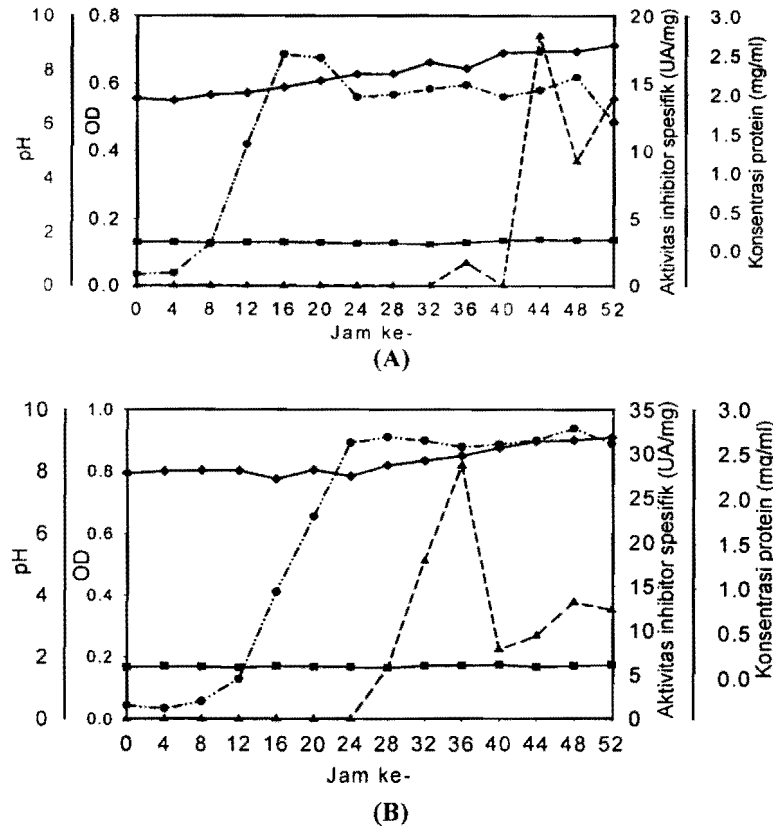
Hasil penelitian menunjukkan bahwa perubahan pH tidak banyak memberikan perubahan terhadap semua parameter yang diamati (Gambar 1). Namun ada beberapa hal yang dapat disimpulkan, yaitu bahwa isolat 6A3 yang ditumbuhkan pada medium kaya faktor pertumbuhan (konsentrasi *yeast extract* tinggi, yaitu 1% (w/v)) akan lebih memanfaatkan media tersebut untuk pertumbuhan sel bakteri sehingga inhibitor protease diproduksi sangat rendah. Pada saat jumlah nutrisi pada media berkurang pertumbuhan sel menjadi lambat, namun sebaliknya inhibitor protease diproduksi dengan aktivitas maksimum. Selama waktu inkubasi hingga 20 jam terjadi kenaikan protein. Hal ini diduga karena terjadinya pertumbuhan sel bakteri dan juga terjadi sekresi yang merupakan campuran antara inhibitor protease dan senyawa lain yang bukan inhibitor protease. Kandungan protein yang menurun setelah waktu inkubasi lebih dari 20 jam, bisa disebabkan oleh pemanfaatan protein tersebut oleh bakteri, mengingat konsentrasi *yeast extract* yang merupakan faktor pemacu pertumbuhan bakteri pada media semakin menipis, begitu pula dengan *special peptone* yang juga telah digunakan oleh bakteri untuk pertumbuhannya. Selama waktu inkubasi terjadi kenaikan pH sebesar 2 unit dengan nilai pH yang hampir sama untuk kedua perlakuan.

Pada media G01-272(YE0,5) dengan komposisi glukosa 0,1% (w/v), *yeast extract* 0,5% (w/v) dan pH awal media 7, inhibitor protease dari isolat 6A3 dihasilkan selama inkubasi 36-52 jam dengan aktivitas tertinggi (18,519 U/mg protein) pada fase stasioner (OD 0,58) setelah inkubasi 44 jam seperti dapat dilihat pada Gambar 2A. Pada kondisi tersebut pH medium sekitar 8,69, sedangkan protein supernatannya adalah 0,144 mg/ml. Kondisi yang sama dapat dilihat pada media yang sama, namun pH medium awal 8 (G01-272(YE0,5)). Pada kondisi ini pun inhibitor protease dihasilkan selama inkubasi 28-52 jam dengan aktivitas tertinggi (28,636 U/ mg protein) pada pengamatan ke-36. Inhibitor tersebut juga dihasilkan pada fase stasioner dan pada saat konsentrasi protein supernatannya 0,149 mg/ml seperti dapat dilihat pada Gambar 2B.

Berdasarkan Gambar 2 dapat disimpulkan bahwa konsentrasi *yeast extract* sebesar 0,5% (w/v) masih cukup besar sehingga bakteri lebih memanfaatkan komponen tersebut untuk pembentukan sel daripada untuk produksi inhibitor protease. Pada saat kondisinya ekstrim, yaitu nutrisi sudah terbatas, maka bakteri memperlambat pertumbuhannya dengan mensekresikan inhibitor protease tersebut. Selama inkubasi terjadi kenaikan pH 2 unit pada isolat 6A3 yang ditumbuhkan pada media awal 7, dan 1 unit pada pH awal media 8.



Gambar 1. Aktivitas inhibitor protease (UA/mg), protein, OD, pH isolat 6A3 pada media glukosa 0,1% (w/v), *special peptone* 0,5% (w/v), *yeast extract* 1,0% (w/v), *trace element* 0,2% (v/v) (A) pH awal 7 (G01-172) ; (B) pH awal 8 (G01-182) -▲- aktivitas inhibitor, -●- OD, -◆- pH, -■- konsentrasi protein



Gambar 2. Aktivitas inhibitor protease (UA/mg), protein, OD, pH isolat 6A3 pada media glukosa 0,1% w/v, special peptone 0,5% w/v, yeast extract 0,5% w/v, trace element 0,2% v/v (A) pH awal 7 (G01-272(YE0,5)) ; (B) pH awal 8 (G01-282(YE0,5)) -▲- aktivitas inhibitor, -●- OD, -◆- pH, -■- konsentrasi protein

Kondisi yang berbeda terjadi ketika konsentrasi yeast extract diturunkan lagi menjadi sepersepuluh dari komposisi semula, yaitu 0,1% (w/v). Pada medium G01-272 (glukosa 0,1% (w/v), yeast extract 0,1% (w/v), dan pH awal medium 7) inhibitor protease dihasilkan selama inkubasi 0-20 jam dengan aktivitas tertinggi (22,147 U/mg protein) dalam waktu inkubasi yang relatif singkat, yaitu 8 jam. Pada kondisi tersebut pertumbuhan bakteri berada pada fase menjelang logaritmik (OD 0,59). Parameter lain yaitu pH menunjukkan nilai 7 dan konsentrasi protein 0,270 mg/ml. Perjalanan waktu produksi inhibitor dengan perlakuan tersebut disajikan pada Gambar 3A. Ketika pH dinaikkan menjadi 8, inhibitor protease dihasilkan selama inkubasi 0-12 jam dengan aktivitas tertinggi (16,374 U/mg protein) juga setelah inkubasi 8 jam, pada kondisi tersebut pertumbuhan bakteri berada pada fase menjelang logaritmik (OD 0,217), dengan nilai pH 7,4 dan konsentrasi protein 0,461 mg/ml seperti terlihat pada Gambar 3B.

Gambar 3 menggambarkan bahwa penurunan konsentrasi yeast extract hingga konsentrasi dalam media menjadi 0,1% (w/v) tidak digunakan untuk pertumbuhan bakteri, namun justru digunakan oleh bakteri untuk mensekresikan inhibitor protease. Adapun tujuannya adalah agar pertumbuhan bakteri tersebut tidak terlalu cepat mengikat terbatasnya media yang ada. Hal ini bisa dilihat dari nilai optical density yang lebih rendah dibandingkan

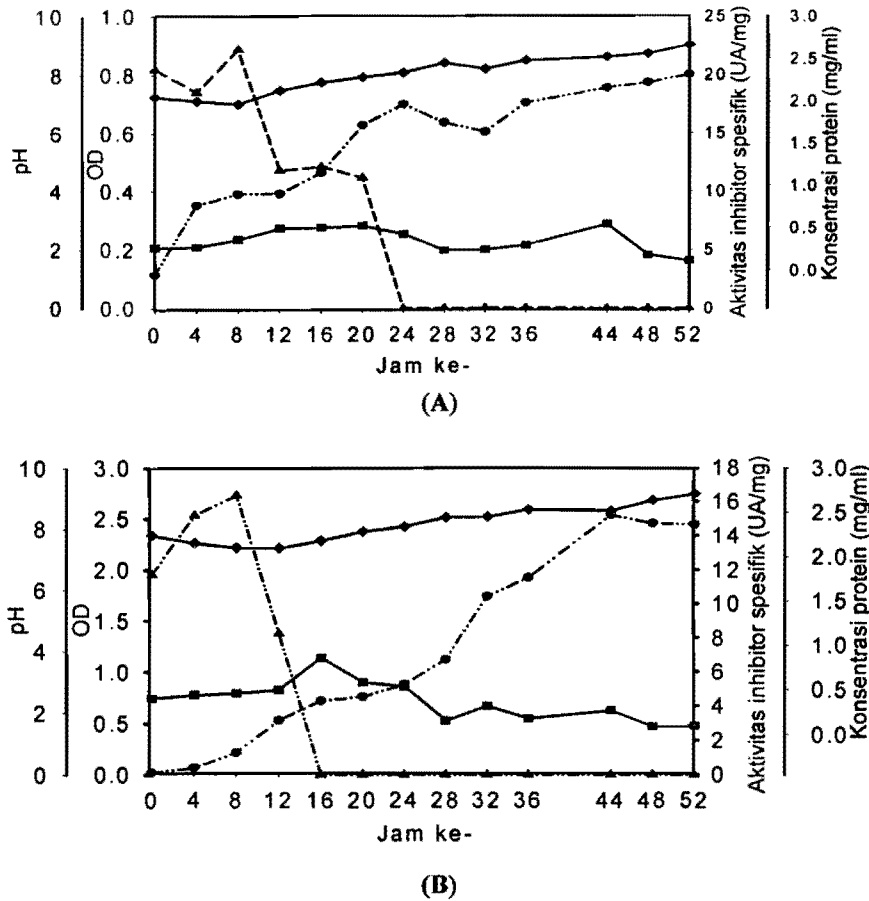
dengan perlakuan lain. Ini berarti bahwa dengan konsentrasi yeast extract yang rendah akan mempercepat sekresi inhibitor protease. Selama inhibitor protease diproduksi, yaitu selama waktu inkubasi 0-20 jam, terjadi kenaikan protein. Hal ini menandakan bahwa inhibitor protease yang disekresikan berupa protein.

Disamping perlakuan di atas, dalam optimasi media ini juga dilakukan perbandingan dengan media marine broth (MB) yang ditambah dengan glukosa 0,05% (w/v). Adapun komposisi media marine broth meliputi special peptone 0,5% (w/v), yeast extract 0,2% (w/v), NaCl 2% (w/v), trace element 0,2% (v/v). Adapun tujuannya adalah untuk melihat pengaruh konsentrasi glukosa terhadap aktivitas maksimum yang mungkin dicapai.

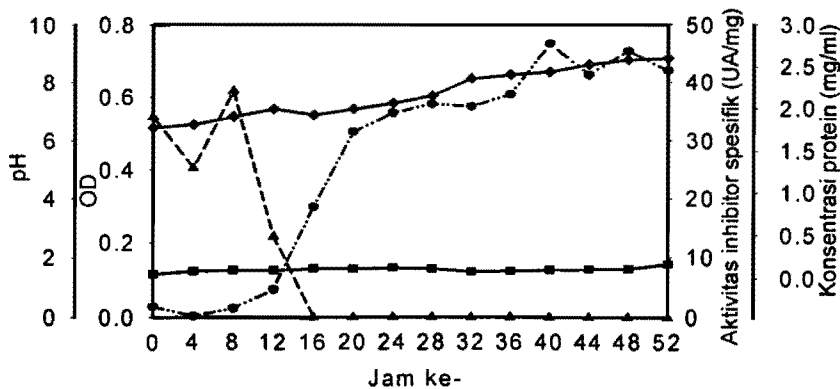
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada media MB yang ditambah dengan glukosa 0,05% (w/v) inhibitor protease dihasilkan selama inkubasi 0-12 jam dengan aktivitas tertinggi (38,482 U/mg protein) dihasilkan pada fase menjelang logaritmik (OD 0,024) selama waktu inkubasi 8 jam sebagaimana disajikan pada Gambar 4. Data tersebut juga menunjukkan pada media MB yang ditambah dengan glukosa 0,05% (w/v) dengan konsentrasi yeast extract rendah (0,2% w/v), inhibitor protease dihasilkan pada waktu yang lebih singkat. Kondisi ini sama dengan penggunaan yeast extract 0,1% (w/v). Ini berarti konsentrasi yeast extract 0,2% (w/v) pada medium lebih digunakan

untuk sekresi inhibitor protease, dengan demikian pertumbuhan bakteri menjadi lebih lambat. Namun jika dibandingkan aktivitas inhibitor protease maksimum, ternyata inhibitor protease yang dihasilkan pada media MB yang ditambah glukosa 0,05% (w/v) lebih tinggi dibandingkan dengan inhibitor yang dihasilkan pada media yang mengandung *yeast extract* 0,1% (w/v) namun konsentrasi glukosa lebih tinggi (0,1% w/v). Hal ini didukung oleh pertumbuhan sel bakteri yang jauh

lebih lambat pada media yang rendah glukosa (Gambar 4) dibandingkan dengan media yang mengandung glukosa yang lebih tinggi (Gambar 3). Ini berarti bahwa glukosa yang merupakan sumber C mendukung pertumbuhan sel bakteri (Gambar 3). Sebaliknya konsentrasi glukosa yang rendah (Gambar 4) menyebabkan pertumbuhan sel lambat dan sel bakteri memproduksi inhibitor protease dengan aktivitas lebih tinggi.



Gambar 3. Aktivitas inhibitor protease (UA/mg), protein, OD, pH isolat 6A3 pada media glukosa 0,1% (w/v), *special peptone* 0,5% (w/v), *yeast extract* 0,1% (w/v), *trace element* 0,2% (v/v) (A) pH awal media 7 (G01-272); (B) pH awal media 8 (G01-282)) -▲- aktivitas inhibitor, -●- OD, -◆- pH, -■- konsentrasi protein



Gambar 4. Aktivitas inhibitor protease (U/Amg), protein, OD, pH isolat 6A3 pada media MB (*special peptone* 0,5% (w/v), *yeast extract* 0,2% (w/v), NaCl 2,0% (w/v), *trace element* 0,2% (v/v) ditambah glukosa 0,05 % (w/v) -▲- aktivitas inhibitor, -●- OD, -◆- pH, -■- konsentrasi protein

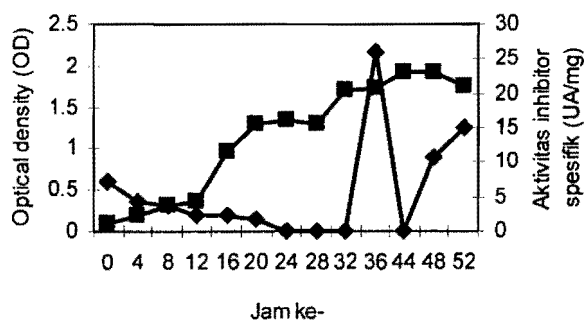
Secara ringkas pengaruh perlakuan media terhadap aktivitas inhibitor protease disajikan pada Tabel 1. Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat secara keseluruhan bahwa peningkatan konsentrasi *yeast extract* akan menunda dihasilkannya inhibitor dengan aktivitas maksimum, sebaliknya pada konsentrasi yang rendah akan mempercepat dihasilkannya inhibitor protease secara maksimum.

Gambar 5 (A-C) memperlihatkan pengaruh konsentrasi *yeast extract* pada konsentrasi glukosa 0,1% (w/v) dan pH awal 7 pada medium pertumbuhan selama inkubasi 52 jam. Pengamatan dilakukan selama 52 jam mengingat isolat 6A3 selama waktu tersebut masih berada pada fase stasioner. Gambar 5A menunjukkan bahwa konsentrasi *yeast extract* 1% pada medium pertumbuhan menyebabkan pada awal hingga 32 jam inkubasi aktivitas inhibitor protease rendah. Aktivitas inhibitor protease tertinggi setelah isolat diinkubasi 36-52 jam. Pola pembentukan demikian, dengan laju pembentukan produk seiring dengan laju pertumbuhan bakteri disebut dengan *growth*

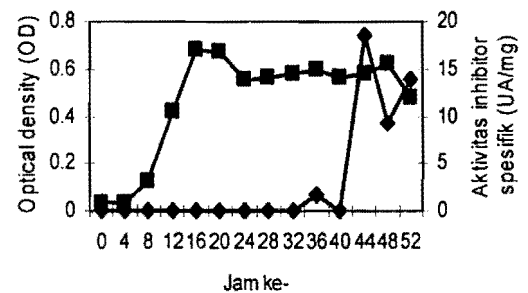
associated. Kondisi yang berbeda terjadi bila pada medium pertumbuhan bakteri mengandung *yeast extract* dengan konsentrasi 0,5% (w/v). Pada kondisi ini, inhibitor protease mulai dihasilkan saat bakteri berada fase stasioner yaitu selama diinkubasi 36-52 jam dengan aktivitas tertinggi selama waktu inkubasi 44 jam. Hal ini menunjukkan bahwa laju pembentukan produk (inhibitor protease) tidak seiring dengan laju pertumbuhan sel bakteri atau disebut dengan pola *non growth associated*. Ketika konsentrasi *yeast extract* dalam medium diperkecil hingga 0,1% (w/v), inhibitor protease diproduksi sejak awal inkubasi hingga 20 jam dengan aktivitas cukup tinggi. Aktivitas tertinggi dihasilkan setelah inkubasi 8 jam dengan pola pembentukan produk *growth associated*. Adanya pola pembentukan produk yang berbeda yaitu *growth associated* dan *non growth associated* pada konsentrasi *yeast extract* yang berbeda menunjukkan bahwa produksi inhibitor protease oleh isolat 6A3 adalah *mixed growth associated*.

Tabel 1. Aktivitas inhibitor protease maksimum dari isolat 6A3 pada perlakuan *yeast extract* (YE) dan pH berbeda, dibandingkan dengan media *marine broth*

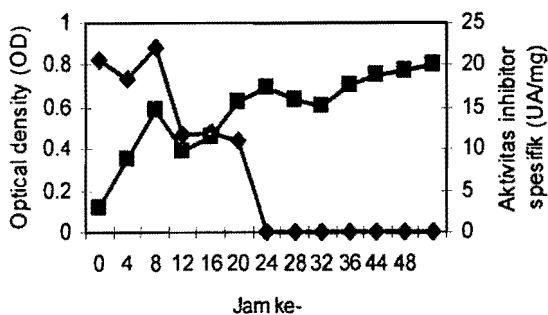
Perlakuan		Waktu inkubasi (jam)	OD	pH	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktiv inhibitor spesifik (U/mg)
YE 1% (w/v)	pH 7	36	1,74	8,50	0,200	26,02
	pH 8	36	1,70	8,36	0,260	23,57
YE 0,5% (w/v)	pH 7	44	0,58	8,69	0,144	18,52
	pH 8	36	0,88	8,51	0,149	28,64
YE 0,1% (w/v)	pH 7	8	0,59	7,00	0,360	22,15
	pH 8	8	0,22	7,40	0,460	18,24
MB (YE 0,2% w/v) + (glukosa 0,05% w/v)	pH 7	8	0,02	6,82	0,100	38,48



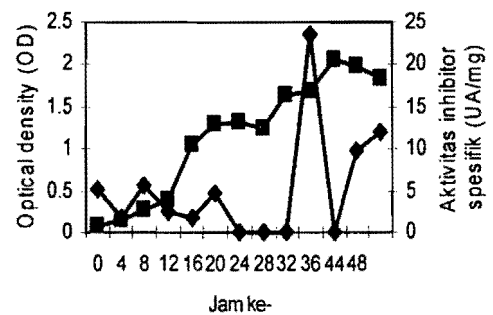
(A)



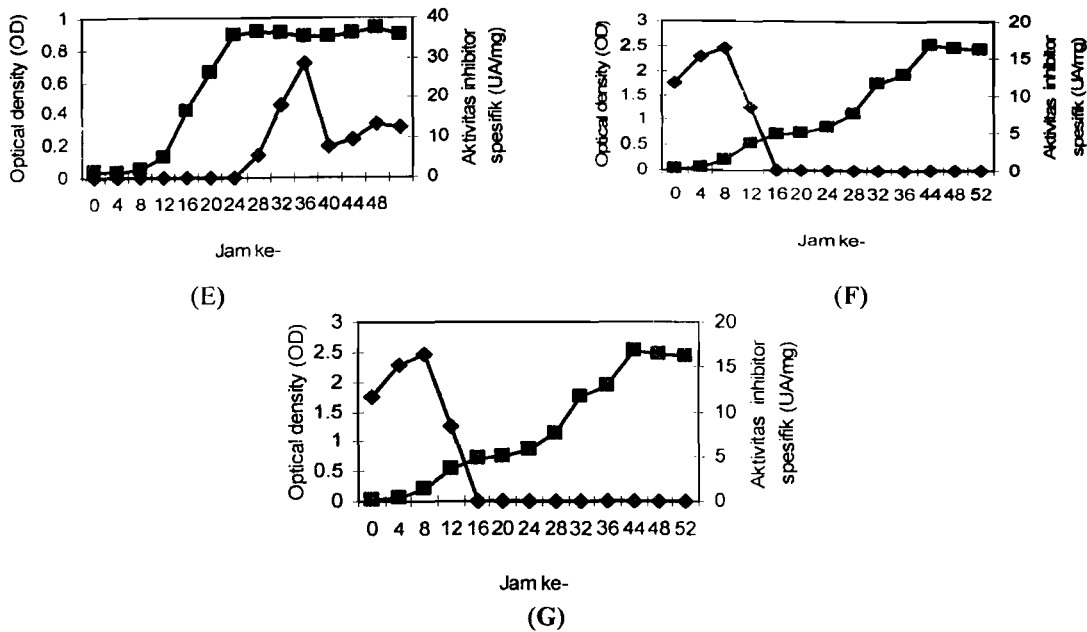
(B)



(C)



(D)



Gambar 5. Aktivitas inhibitor protease (UA/mg) dan *optical density* (OD), pH awal media 7 (*yeast extract* 1% (A), 0,5% (B), 0,1% (C)); pH awal 8 (*yeast extract* 1% (D), 0,5% (E), 0,1% (F)); dan MB+glukosa 0,05%; -■- OD dan -◆- aktivitas inhibitor protease (UA/mg)

Gambar 5 (D-F) memperlihatkan pengaruh konsentrasi *yeast extract* pada konsentrasi glukosa 0,1% (w/v) dan pH awal 8 pada medium pertumbuhan selama inkubasi 52 jam. Secara umum, pola pembentukan produk sama seperti pada Gambar 5 (A-C). Perbedaannya terletak pada aktivitas maksimum inhibitor protease yang dihasilkan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perubahan pH awal medium, dalam hal ini pH 7 dan 8, tidak memberikan perubahan yang berarti pada produksi inhibitor protease. Kondisi yang berbeda mungkin saja terjadi jika pH medium dibuat lebih ekstrim, misalnya diturunkan di bawah 7, mengingat isolat tersebut masih dapat tumbuh pada pH sedikit asam (pH 4).

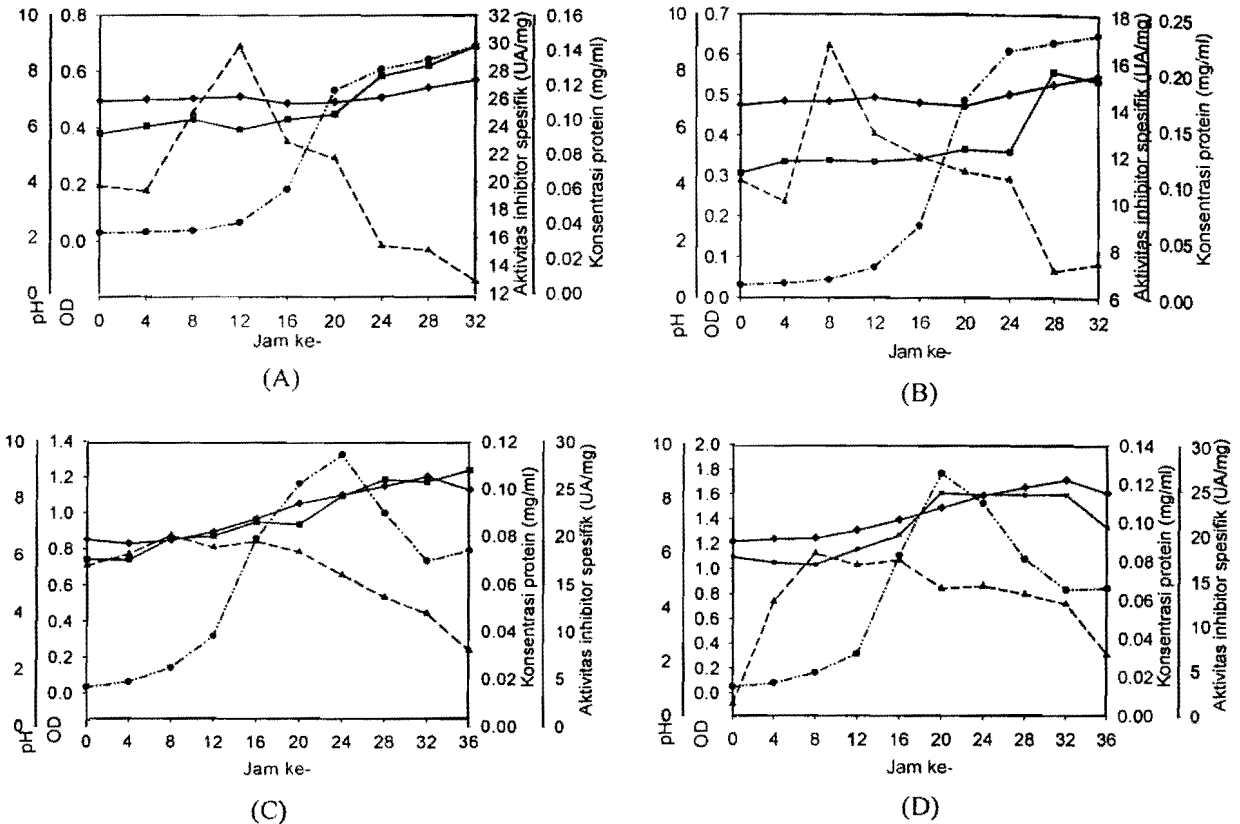
Pola pembentukan produk pada media *marine broth* yang ditambah glukosa 0,05% (w/v) termasuk *growth associated*, karena laju pembentukan produk seiring dengan pertumbuhan sel bakteri (Gambar 5G).

Mengingat aktivitas inhibitor protease pada media MB yang ditambah glukosa 0,05% (w/v) mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan perlakuan lain dan juga didapatkan pada waktu inkubasi yang singkat, maka penelitian dilanjutkan menggunakan glukosa 0,05% (w/v) dengan melakukan variasi *yeast extract* 0,1% (w/v); 0,2% (w/v); 0,3% (w/v); dan 0,4% (w/v). Konsentrasi *yeast extract* yang digunakan hanya sampai 0,4% (w/v), karena hasil sebelumnya menunjukkan bahwa pada konsentrasi *yeast extract* lebih besar (0,5% (w/v)), inhibitor dihasilkan dengan aktivitas tertinggi pada waktu yang lebih lama, yaitu 36-44 jam.

Pola produksi inhibitor protease pada media G005Y01 (glukosa 0,05% w/v dan *yeast extract* 0,1% w/v), media G005Y02 (glukosa 0,05% w/v

dan *yeast extract* 0,2% w/v), media G005Y03 (glukosa 0,05% w/v dan *yeast extract* 0,3% w/v) dan media G005Y04 (glukosa 0,05% w/v dan *yeast extract* 0,4% w/v) disajikan pada Gambar 6. Data mengenai aktivitas inhibitor protease tertinggi dan kondisi yang lain secara ringkas disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Gambar 6 dapat dijelaskan bahwa inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi dihasilkan pada fase menjelang logaritmik. Ini menandakan bahwa konsentrasi *yeast extract* sebesar 0,1% (w/v)-0,4%(w/v) tidak digunakan untuk pertumbuhan bakteri, namun digunakan untuk mensekresikan inhibitor protease. Dampaknya adalah terjadi pertumbuhan bakteri yang lebih lambat, namun terjadi peningkatan pertumbuhan bakteri seiring dengan peningkatan konsentrasi *yeast extract* yang dicobakan seperti dapat dilihat pada Tabel 2. Dampak dari konsentrasi glukosa rendah adalah terjadinya siklus hidup yang pendek dan juga lambatnya pertumbuhan bakteri tersebut. Hal inilah yang menyebabkan pengamatan diperpendek dari 52 jam menjadi 32 jam. Diantara perlakuan ini, maka media yang dipilih untuk penelitian selanjutnya adalah media G005Y01 karena menghasilkan inhibitor dengan aktivitas tertinggi yaitu 29,70 U/mg dengan waktu inkubasi 12 jam. Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat adanya pergeseran waktu untuk mencapai aktivitas inhibitor protease maksimum yang disebabkan terlalu rendahnya konsentrasi *yeast extract* (0,1% w/v) dan juga rendahnya glukosa (0,05% w/v), sehingga untuk mencapai OD yang cukup (0,1-0,2) untuk produksi inhibitor protease dengan aktivitas maksimum membutuhkan waktu yang lebih lama.



Gambar 6. Aktivitas inhibitor protease (U/mg), OD, pH, dan protein isolat 6A3 pada media Glukosa 0,05% w/v, special peptone 0,5% w/v, trace element 0,2% v/v, pH7, yeast extract (A) 0,1% w/v, (B) 0,2% w/v, (C) 0,3% w/v, (D) 0,4% w/v -▲- aktivitas inhibitor, -●- OD, -◆- pH, -■- konsentrasi protein

Tabel 2. Aktivitas inhibitor maksimum dari isolat 6A3 pada media dengan glukosa 0,05 % w/v dan yeast extract 0,1-0,4 % w/v

Media	Waktu inkubasi (jam)	OD	pH	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktivitas inhibitor spesifik (U/mg)
G005Y01	12	0,067	7,07	0,094	29,70 ^{**}
G005Y02	8	0,045	6,92	0,121	16,66
G005Y03	8	0,144	9,51	0,079	20,05
G005Y05	8	0,166	6,54	0,078	17,95

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Chromohalobacter sp. 6A3 dapat memproduksi inhibitor protease *Pseudomonas aeruginosa* dengan aktivitas yang tinggi serta waktu produksi yang lebih singkat pada media produksi dengan komposisi sebagai berikut: glukosa 0,05%(w/v), yeast extract 0,1%(w/v), trace element 0,2%(v/v), special peptone 0,5%(w/v), NaCl 2%(w/v), dan pH 7 dengan kondisi produksi, yaitu digoyang dengan kecepatan 150 rpm, 30 °C, selama 12 jam.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa produksi inhibitor protease dengan komposisi media yang berbeda menyebabkan perbedaan pola sekresi inhibitor protease. Hal ini diduga terdapat 2 jenis inhibitor yang disekresikan. Oleh karena itu penting

dipelajari tentang mekanisme sekresi inhibitor protease serta faktor-faktor yang mempengaruhinya sebagai data dasar untuk produksi inhibitor yang diinginkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ditjen Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Bersaing XI tahun 2003-2004 atas nama Tati Nurhayati.

DAFTAR PUSTAKA

Ahn Y.B., S.K. Rhee, D.E. Fennell, L.J. Kerkhof, U. Hentschel, M.M. Haggblom, M.M. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4159-4166.

- Baehaki A., M.T. Suhartono, N.S. Palupi, T. Nurhayati. 2008. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 19(1):80-86.
- Desniar, T. Nurhayati, M.T. Suhartono, E.M. Isa. 2006. Modifikasi media *marine broth* pada produksi inhibitor protease dari bakteri *Acinetobacter baumannii* yang hidup bersimbiosis dengan sponge *Plakortis nigra*. *Buletin THP* 9(1):67-76.
- Elyakov G.B., T. Kuznetsova, V.V. Mikhalov, I.I. Maltsev, V.G. Bionov, S.A. Fedoreyev. 1991. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experintia* 47:632-633.
- Flowers A.E., M.J. Garson, R.I. Webb, E.J. Dumdei, R.D. Charan. 1998. Celluler origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res.* 292:597-607.
- Hammond J.B., W. Kruger. 1988. The Bradford method for protein quantitation. Di dalam: Walker, M., editor. *New Protein Technique*. JHumana Press, Clifton. New Jersey.
- Imada C. 2000. Isolation of protease inhibitor producing marine microorganisms and general properties of the inhibitors. *Proceeding of International Symposium on Marine Biotechnology (ISMB2000)* 29-31 May 2000. Center for Coastal and Marine Resources Studies. IPB. pp. 35-42.
- Imada C., N. Taga, N. Maeda. 1985. Cultivation conditions for subtilisin inhibitor-producing bacterium and general properties of the inhibitor "marinostatin". *Bull of Jap Soc of Sci Fish* 51: 805-810.
- Lee Y.K., J.H. Lee, H.K. Lee. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 30:254-264.
- Mayer A.M.S. dan V.K.B. Lehmann. 2000. Marine pharmacology. *The Pharmacological* 42:62-69.
- Nurhayati T., M.T. Suhartono, L. Nuraida, L., S.B. Poerwanto. 2006a. Karakterisasi awal inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Hayati* 13(2):58-64.
- Nurhayati T., M.T. Suhartono, Desniar, R. Suwardinni, R. 2006b. Pengaruh variasi pH dan NaCl terhadap produksi inhibitor protease yang dihasilkan oleh *Acinetobacter baumannii* (bakteri yang berasosiasi dengan spons *Plakortis nigra*). *Buletin THP* 9(2):56-69.
- Osclarit J.M., H. Okada, S. Ohta, K. Kaminura, Y.Yamaoka, T. Iizuka, S. Miyashiro, S. Ikegami. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbiol.* 78:7-16.
- Singh M.P., 2003. Novel α -pyrones produced by a marine *Pseudomonas* sp. F92S91. *J. Antibiotics* 56:1033-1044.
- Stierle A.C., J.H. Cardellina II, F.L. Singleton. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44:1021.
- Walter H.E. 1984. Proteinases (Protein as Substrates). Methods with Haemoglobin, Casein, and Azocoll as Substrate. Di dalam: Bergmeyer, Graßl M., ed. *Methods of Enzymatic Analysis* 3rd edition. Verlag Chemie. Weinheim.
- Webster N.S., K.J. Wilson, L.L. Blackall, R.T. Hill, 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:434-444.