

Karakterisasi Awal Inhibitor Protease dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu

Preliminary Characterization of Protease Inhibitor from Bacteria-Associated with Sponge from Panggang Island, Seribu Islands

TATI NURHAYATI¹, MAGGY THENAWIDJAJA SUHARTONO²,
LILIS NURAIDA², SRI BUDIARTI POERWANTO³

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fateta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 8 Maret 2006/Disetujui 30 Mei 2006

Pathogenic bacteria produced protease that involved in molecular mechanism of foodborne disease. Produced protease involved in molecular mechanisms of foodborne diseases. The purpose of this research was to screen, identify and characterize the potential microorganisms associated with sponge as producer of protease inhibitor. Among 96 isolates examined, four isolates i.e 10A6, 6A3, 9A51, and 1A12 yielded protease inhibitors which were potential to inhibit protease substrates (40-90%). One of the most potential protease inhibitor producer, the bacteria isolate 6A3, was identified as *Chromohalobacter* sp. *Chromohalobacter* sp.6A3 produced protease inhibitor with optimum temperature and pH 30 °C and 5, respectively. The inhibitor activity was stable when incubated at 40 °C for ten minutes or at 30 °C for 8 hours.

Key words: Bacteria, *Chromohalobacter* sp., protease inhibitor, screen, sponge

PENDAHULUAN

Bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas* sp. dapat menyebabkan penyakit yang dikenal sebagai *foodborne diseases*. Salah satu mekanisme timbulnya penyakit adalah dengan dihasilkannya protease dari bakteri tersebut. Dalam dasawarsa terakhir ini perhatian terhadap protease sebagai target senyawa obat bagi penyakit asal bakteri (seperti pneumonia, kolera, tifus, *gonorrhoe*), virus (seperti influenza dan HIV), dan malaria serta kanker, bahkan penyakit degeneratif seperti *alzheimer* meningkat pesat. Saat ini sudah banyak obat-obatan dengan mekanisme kerja yang menghambat kerja protease. Namun masih terus dilakukan penelitian untuk mencari inhibitor protease alami dari berbagai sumber seperti bakteri, fungi, juga organisme laut seperti spons, dan tunikata. Di antara organisme laut, spons merupakan penghasil komponen bioaktif terbanyak (Mayer & Lehmann 2000), termasuk di dalamnya senyawa inhibitor enzim (Lee *et al.* 2001).

Bakteri yang berasosiasi dengan spons juga menghasilkan komponen bioaktif (Webster *et al.* 2001). Hal ini mungkin karena jumlah koloni bakteri dan sianobakteri yang ada di spons, terutama *Aplysina aerophoba*, dapat mencapai 40% dari biomassa spons (Ahn *et al.* 2003). Mikroorganisme tersebut membentuk suatu simbiotik dengan spons baik di dalam inti sel (simbiosis intranukleus), di dalam sitoplasma sel tubuh spons (simbiosis intraseluler), di sisi dalam tubuh spons (endosimbiosis ekstraseluler), dan di bagian luar tubuh

spons (eksosimbiosis ekstraseluler). Hubungan simbiotik ini dapat terjadi karena spons merupakan hewan yang makan dengan cara menyaring makanan (*filter feeder*). Mikroorganisme dapat menjadi nutrisi atau makanan bagi spons. Lee *et al.* (2001) melaporkan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis bakteri simbiotiknya. Dengan demikian, spons dapat mengandung komponen bioaktif yang sama dengan simbiotiknya. Sebagai contoh *Micrococcus* sp. menghasilkan komponen diketopiperazina, 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 *Hyatella* sp. (Osclarit *et al.* 1994). Flowers *et al.* (1998) melaporkan bahwa simbion spons *Oscillatoria spongelliae*, mengandung senyawa diketopiperazinklorina yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu *Dysidea herbacea*.

Informasi tersebut menunjukkan bahwa sudah cukup banyak simbion spons yang teridentifikasi positif menghasilkan komponen bioaktif yang sama dengan inangnya. Namun belum pernah dilaporkan komponen bioaktif yaitu inhibitor protease yang merupakan protein dari bakteri simbion spons. Penelitian ini dilakukan untuk mencari simbion spons yang potensial sebagai penghasil inhibitor terhadap protease bakteri patogen, sehingga diharapkan akan dapat memutus salah satu jalan bakteri patogen penyebab penyakit.

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-622915,
Fax. +62-251-622916, E-mail: nurhayati7870@yahoo.com

Spons banyak terdapat di Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. Hal ini ditandai dengan penutupan karang yang termasuk kategori sedang hingga baik (34.72-62.86%) dengan indeks keanekaragaman yang tinggi yaitu berkisar 0.2-2.81 (Nurhayati *et al.* 2004). Dengan demikian, lokasi ini tepat untuk pengambilan spons sebagai sumber bakteri penghasil inhibitor protease. Tujuan penelitian ini adalah menapis, mengidentifikasi, dan mengkarakterisasi mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons sebagai penghasil inhibitor protease.

BAHAN DAN METODE

Bahan. Bakteri dalam penelitian ini meliputi bakteri patogen penghasil protease, yaitu *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* yang diperoleh dari Rumah Sakit Pusat Pertamina, Jakarta. Bakteri yang digunakan sebagai sumber inhibitor protease berasal dari spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. Analisis karakteristik biokimia menggunakan *Microbact Kit* 12A dan 12B.

Koleksi Contoh Spons. Contoh spons diambil dari Perairan Pulau Panggang, Kepulauan Seribu sebanyak sepuluh jenis dan diambil pada kedalaman berbeda (4-12 m). Contoh disimpan dalam media *marine broth*: gliserol = 1:1, selanjutnya dimasukkan ke kotak pendingin (5-10 °C). Spons diidentifikasi berdasarkan bentuk dan warna (Allen & Steene 1994).

Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons. Masing-masing spons (1 g) dihancurkan menggunakan mortar, lalu diencerkan sebanyak 10 kali dalam *marine broth*. Supernatan sebanyak 200 µl disebar pada *marine agar* (MA) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama lima hari. Pemurnian dilakukan dengan cara menggoresnya berulang kali, hingga didapat koloni tunggal.

Penapisan Bakteri Penghasil Inhibitor Protease yang Berasosiasi dengan Spons. Penapisan dengan menggunakan metode *plate agar* susu skim dua lapis (Modifikasi Imada 1985a). Lapisan bawah terdiri atas MA, sedangkan lapisan atas terdiri atas luria bertani agar (LA) yang diberi skim 1.5 %. Isolat yang akan ditapis, ditusukkan pada lapisan bawah (MA), lalu diinkubasi 24, 48, dan 72 jam pada suhu 30 °C. Isolat yang tumbuh dibuang, kemudian diberi lapisan atas. Isolat bakteri patogen ditusukkan pada bagian atas lalu diinkubasi 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang positif menghasilkan inhibitor protease menunjukkan tidak adanya atau berkurangnya zona bening di sekitar koloni bakteri patogen.

Karakterisasi Bakteri Penghasil Inhibitor Protease. Karakterisasi fisiologis untuk isolat yang potensial menghasilkan inhibitor protease, meliputi pewarnaan gram (Cappucino & Sherman 1983), pewarnaan spora (Lay 1994), motilitas (Jenie & Fardiaz 1989), dan uji biokimia dengan *microbact* 12A dan 12B. Adapun uji biokimiawi yang diamati menggunakan metode tersebut meliputi lisina, ornitin, H₂S, glukosa, manitol, xilosa, ortonitrofenil-β-d-galaktopiranosida (ONPG), indol, urease, Voges Preskauer (VP), asam sitrat, dan triptofan deaminase (TDA) (*Microbact Kit* 12A), gelatin, malonat, inositol, sorbitol, ramnosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, adonitol, rafinosa, salisin, dan arginina (*Microbact Kit* 12B).

Penentuan Waktu Produksi Inhibitor Protease. Media yang digunakan untuk penentuan waktu produksi inhibitor protease adalah *marine broth*. Tahap propagasi dilakukan pada suhu 30 °C dengan kecepatan *waterbath shaker* 150 rpm hingga mencapai fase logaritmik. Setelah itu dilakukan kultivasi selama 52 jam pada kondisi yang sama. Pengamatan pada penentuan optimasi waktu produksi dilakukan tiap empat jam sekali. Ekstrak kasar didapatkan dengan cara melakukan sentrifugasi terhadap contoh yang diambil pada kecepatan 5.280 g selama 15 menit. Analisis meliputi pH, OD (λ=660 nm), dan konsentrasi protein (metode Bradford) (Hammond & Kruger 1988), dan aktivitas inhibitor protease (modifikasi Imada *et al.* 1985c). Sebagai substrat digunakan protease dari *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* yang diproduksi menurut Baehaki (2004).

Identifikasi Bakteri Penghasil Inhibitor Protease. Identifikasi dilakukan terhadap isolat bakteri yang paling berpotensi sebagai penghasil inhibitor protease berdasarkan hasil pengujian secara kuantitatif. Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan gen 16S rRNA melalui tiga tahap, (i) isolasi DNA, (ii) perbanyakkan gen 16S rRNA menggunakan PCR, (iii) pengurutan DNA. Primer DNA yang digunakan untuk perbanyakkan 16S rRNA adalah 16F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dan 16R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). Kondisi penempelan primer ke urutan DNA (*annealing*) adalah 45 °C selama satu menit (Santosa 2001). Hasil pengurutan DNA dibandingkan dengan data gen 16S rRNA dari *GenBank* menggunakan program pencarian BLAST dari NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) guna memperoleh urutan dengan tingkat homologi yang tinggi dengan urutan nukleotida isolat 6A3. Sebanyak 15 untai urutan DNA dari *GenBank* termasuk urutan DNA isolat 6A3 disusun dengan format FASTA3 untuk dilakukan analisis similaritas menggunakan program ClustalW dari situs www.ebi.ac.uk/clustalW. Hasil yang diperoleh disimpan pada *software* TreeConW, yang selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogenetik dalam format Phylip menggunakan program tersebut dengan replikasi *bootstrap* 100x. Jenis dan nomor akses urutan DNA yang digunakan untuk pembuatan pohon filogenetik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis dan nomor akses bakteri yang digunakan untuk penyusunan pohon filogenetik berdasarkan gen 16S rRNA

Jenis bakteri	Nomor akses
<i>Chromohalobacter canadiensis</i>	AJ295143
<i>Chromohalobacter</i> MAN K24	AB166934.1
<i>Chromohalobacter nigriensis</i>	AJ277205
<i>Chromohalobacter sarecenensis</i>	AB105069.1
<i>Chromohalobacter</i> sp. 1A1-2	AB89308.1
<i>Chromohalobacter</i> sp. Is-Chi	AB189306.1
<i>Cobetia marina</i>	AB167062.1
<i>Deleya marina</i>	M93354.1
<i>Haererehalobacter ostenderiensis</i>	U78786.1
<i>Halomonas elongata</i>	AJ295147
<i>Halomonas nitritophilus</i>	AJ309564.1
<i>Halomonas</i> sp. NT N110	AB167027.1
Isolat 6A3	DQ631801
<i>Pseudomonas beijerinckii</i>	AB021386.1
<i>Pseudomonas</i> sp.	AB055789.1
<i>S. aureus</i>	AY859409

Karakteristik Awal Inhibitor Protease. Karakterisasi dilakukan terhadap isolat yang paling potensial sebagai penghasil inhibitor protease. Beberapa karakteristik awal inhibitor protease yang dilakukan, meliputi: penentuan suhu (10-70 °C) dan pH (3-12) optimum, ketahanan suhu (10-70 °C) selama inkubasi 10 menit, dan kestabilan panas pada kondisi optimum (1-8 jam) (Imada 1985c).

Aktivitas Inhibitor Protease. Prosedur pengukuran inhibitor protease dilakukan sebagai berikut (Imada *et al.* 1985c): 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 *hammerstein* 2% (w/v) dalam larutan bufer TrisCl 50 mM, pH 8 ditambahkan ke dalamnya dan diinkubasi 12 menit pada suhu 30 °C. Setelah diinkubasi, 2 ml asam trikloroasetat (TCA) 5% (w/v) ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim. Campuran disimpan selama 20 menit pada suhu 30 °C untuk mengendapkan kasein yang tidak dicerna enzim. Selanjutnya larutan disentrifugasi pada kecepatan 1810 g selama 10 menit, supernatan diukur pada absorbansi 280 nm.

$$\text{Persentasi penghambatan} = (1-B/A) \times C \times 100$$

A: peningkatan nilai OD tanpa inhibitor setelah diinkubasi 12 menit, B: peningkatan nilai OD dengan penambahan inhibitor setelah diinkubasi 12 menit, C: faktor pengenceran.

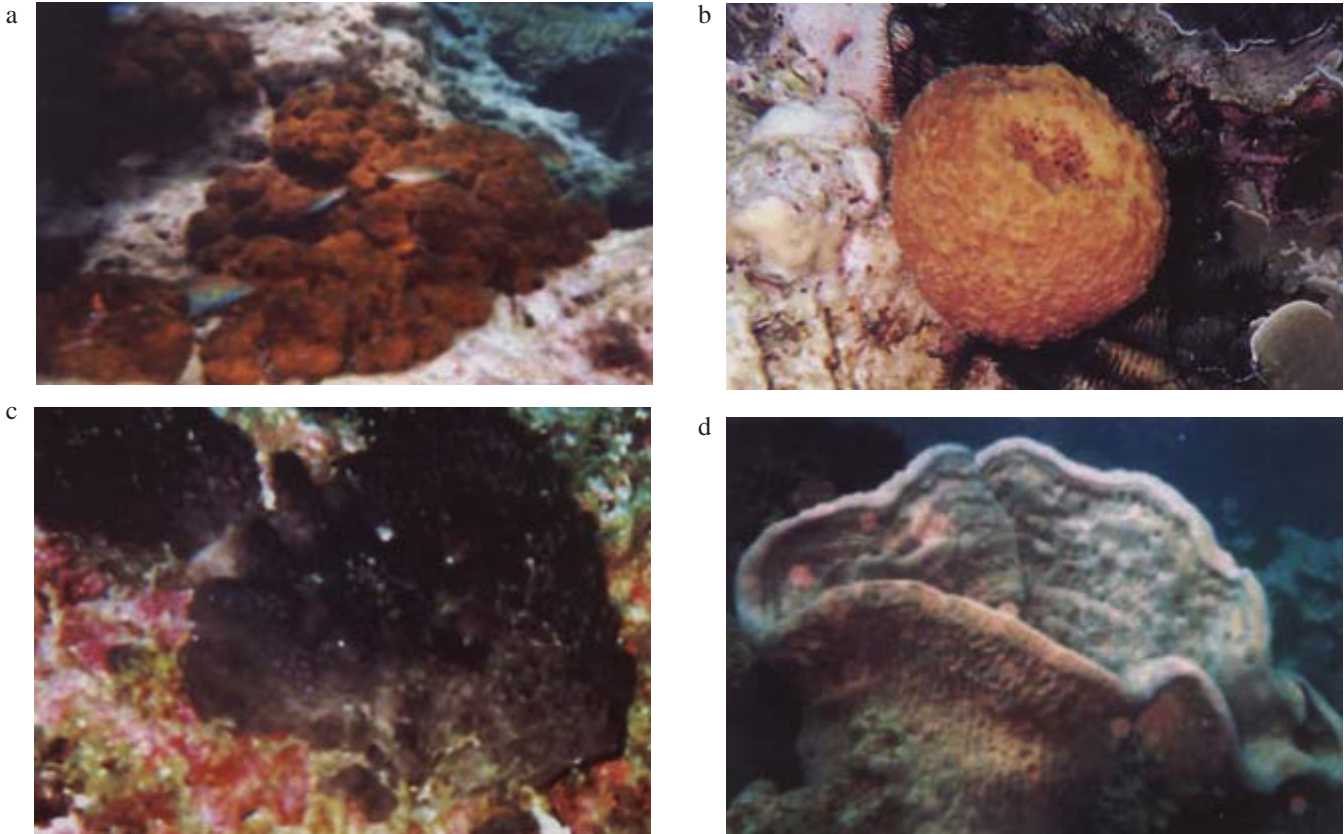
Satu unit aktivitas inhibitor didefinisikan sebagai jumlah inhibitor yang dapat menghambat aktivitas enzim sebanyak 50% pada kondisi di atas.

HASIL

Koleksi Spons. Sepuluh jenis spons berhasil dikumpulkan untuk penapisan bakteri yang berpotensi sebagai penghasil inhibitor protease. Beberapa jenis spons yang berhasil dikumpulkan diantaranya adalah *Jaspis stellifera*, *Jaspis* sp., *Plakortis nigra*, dan *Xestospongia testudinaria* (Gambar 1). Jumlah koloni bakteri yang berhasil diisolasi dari masing-masing spons tidak sama (Tabel 2), paling banyak terdapat pada spons *Jaspis* sp. dan paling sedikit pada spons *J. stellifera*.

Tabel 2. Spesies spons dan jumlah koloni bakteri yang diisolasi dari masing-masing spons

Spesies	Kedalaman (m)	Jumlah koloni/g
<i>J. stellifera</i>	4	100
<i>X. exigua</i>	4	200
<i>Gelliodes</i> sp.	4	1500
<i>Callyspongia muricina</i>	7	3000
<i>Callyspongia</i> sp.	7	4600
<i>X. testudinaria</i>	12	6000
<i>Aplysina</i> sp.	12	100
<i>Reniochalina stalagmitis</i>	10	15500
<i>P. nigra</i>	12	500
<i>Jaspis</i> sp.	5	>30000
Total		59700 koloni



Gambar 1. Jenis spons yang diteliti: a. *J. stellifera*, b. *Jaspis* sp., c. *P. nigra*, dan d. *X. testudinaria*.

Penapisan Bakteri Penghasil Inhibitor Protease. Setelah melalui tahap pemurnian dan seleksi bakteri berdasarkan warna koloni yang berbeda pada masing-masing jenis spons, terdapat 96 jenis isolat yang ditapis guna mencari bakteri yang berpotensi sebagai penghasil inhibitor protease. Isolat yang positif adalah yang menyebabkan bakteri uji (*P. aeruginosa*, *E. coli*, dan *S. aureus*) tidak mampu atau berkurang kemampuannya dalam mendegradasi skim. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening atau berkurangnya zona bening di sekitar bakteri tersebut dibandingkan kontrol. Berdasarkan hasil penapisan terdapat empat isolat yang diduga menghasilkan inhibitor protease, yaitu isolat 6A3, 10A6, 9A51, dan 1A12 (Tabel 3).

Karakterisasi Bakteri yang Potensial sebagai Penghasil Inhibitor Protease. Isolat 6A3, 10A6, dan 9A51 merupakan bakteri gram negatif, sedangkan isolat 1A12 merupakan bakteri

gram positif (Tabel 4). Keempat isolat menunjukkan motilitas negatif, ini berarti isolat tersebut tidak mempunyai flagela untuk pergerakannya. Kisaran suhu untuk pertumbuhan tiga isolat (10A6, 9A51, 1A12) sama yaitu 8-37 °C, sementara itu untuk isolat 6A3 cenderung lebih sempit (20-30 °C) dengan kisaran pH pertumbuhan untuk keempat isolat sama yaitu mulai dari asam sampai basa.

Penentuan Waktu Produksi Inhibitor Protease. Isolat yang diduga positif sebagai penghasil inhibitor protease, dilanjutkan dengan uji kuantitatif. Pada pengujian ini substrat yang digunakan adalah protease dari *E. coli* (0.068 U/mg) untuk inhibitor dari isolat 9A51, *P. aeruginosa* (0.405 U/mg) untuk inhibitor dari isolat 6A3, 10A6, dan *S. aureus* (0.051 U/mg) untuk inhibitor dari isolat 1A12. Isolat 6A3 menghasilkan inhibitor protease dengan tingkat penghambatan paling tinggi, yaitu 95.5% (Tabel 5).

Identifikasi Bakteri Penghasil Inhibitor Protease. Identifikasi dilakukan terhadap isolat dengan persentase penghambatan tertinggi, yaitu isolat 6A3. Hasil analisis urutan 16S rRNA dengan FASTA3, menunjukkan tingkat homologi sebesar 96% terhadap *Chromohalobacter* sp. (Gambar 2). Urutan DNA isolat 6A3 mempunyai nomor akses di *GenBank* yaitu DQ631801 dengan 386 pasang basa. Kandungan G + C dari DNA isolat 6A3 adalah 56.48%.

Tabel 3. Isolat bakteri yang positif menghasilkan inhibitor protease

Isolat	Asal spons	Protease yang dihambat		
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
6A3	<i>X. testudinaria</i>	+	-	-
10A6	<i>Jaspis</i> sp.	+	-	-
9A51	<i>P. nigra</i>	-	+	-
1A12	<i>J. stellifera</i>	-	-	+

Tabel 4. Karakteristik taksonomi isolat bakteri penghasil inhibitor protease

Karakteristik	Isolat bakteri dan asal spons			
	10A6 <i>Jaspis</i> sp.	9A51 <i>P. nigra</i>	1A12 <i>J. stellifera</i>	6A3 <i>X. testudinaria</i>
Gram	-	-	+	-
Motilitas	-	-	-	-
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Bentuk sel	Bulat	Bulat	Batang	Batang pendek
Warna koloni	Kuning	Kuning	Cokelat	Kuning muda, Kecokelatan
Pembentukan spora	-	-	-	-
Kisaran suhu pertumbuhan (°C)	8-37	8-37	8-37	20-30
Kisaran pH pertumbuhan	5-9	4-9	6-9	4-8
Konsentrasi NaCl untuk pertumbuhan (%)	1-7	2-10	1-4	2-40
Oxidase	+	-	-	-
Nitrat	+	-	+	-
Lisina	-	+	-	-
Ornitin	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-
Glukosa	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	-
Xilosa	-	+	+	+
ONPG	+	-	+	-
Indol	-	-	+	-
Urease	-	-	-	-
Voges Preskauer (VP)	-	-	-	-
Asam sitrat	-	+	-	-
Triptofan	+	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-
Malonat	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-
Sukrosa	+	-	-	-
Laktosa	-	+	-	-
Arabinosa	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-
Salisin	-	-	-	-
Arginina	+	-	-	-

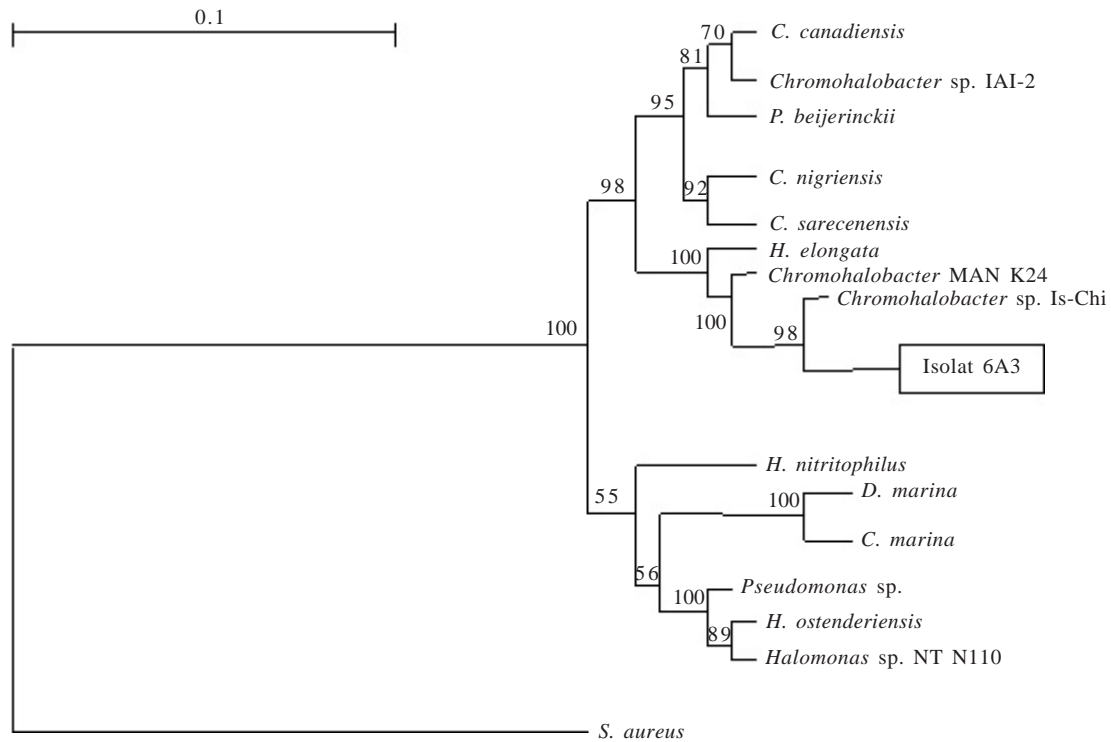
Karakterisasi Awal Inhibitor Protease. Karakterisasi inhibitor protease dilakukan terhadap inhibitor protease yang dihasilkan oleh *Chromohalobacter* sp. 6A3. Berdasarkan hasil karakterisasi didapatkan bahwa inhibitor protease yang dihasilkan oleh isolat tersebut mempunyai suhu dan pH

optimum 30 °C dan 5 (Gambar 3 & 4). Inhibitor tersebut tahan terhadap pemanasan selama 10 menit pada suhu 40 °C dengan aktivitas relatif 95.24% (Gambar 5). Selain itu juga stabil selama delapan jam pada kondisi penyimpanan 30 °C, pH 5 (aktivitas relatif 93.53%) (Gambar 6).

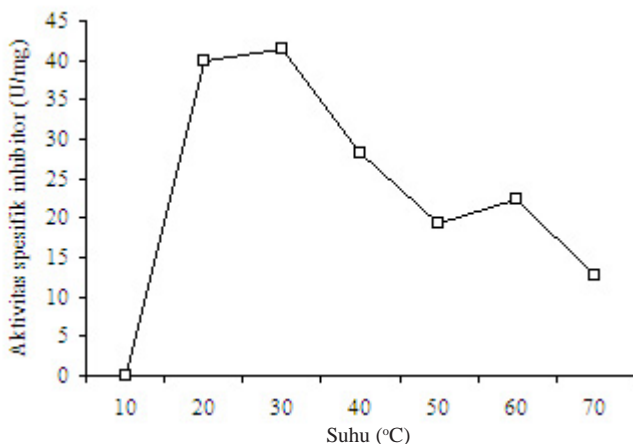
Tabel 5. Waktu produksi optimum isolat penghasil inhibitor protease pada media *marine broth*

Isolat*	Asal spons	Waktu inkubasi (jam)	Penghambatan (%)	OD	pH	Konsentrasi protein (mg/ml)	Fase produksi optimum
10A6	<i>Jaspis</i> sp.	24	72.7	3.312	8.30	0.047	stasioner
9A51	<i>P. nigra</i>	20	93.5	1.626	8.04	0.091	stasioner
1A12	<i>J. stellifera</i>	12-16	40.0	1.104-1.350	6.86-7.63	0.092-0.167	logaritmik
6A3	<i>X. testudinaria</i>	24	95.5	3.054	8.02	0.081	stasioner

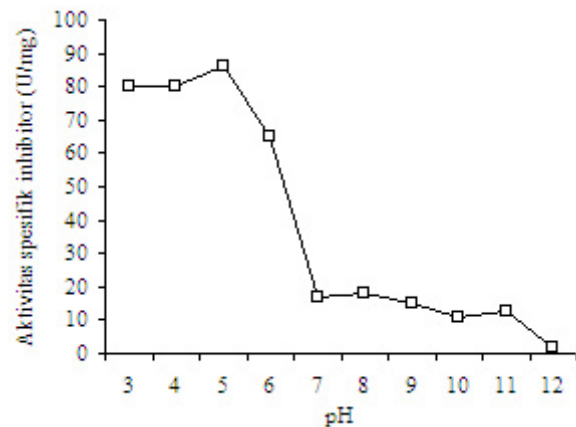
*diisolasi dari spons



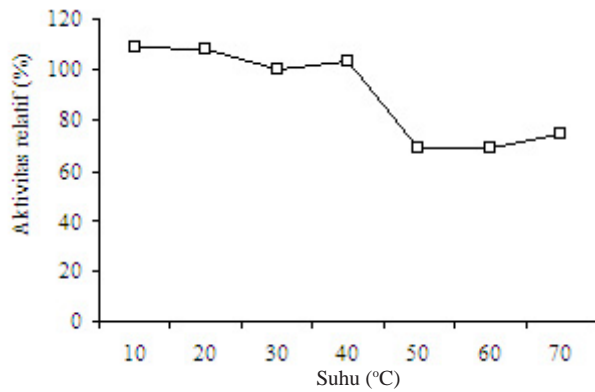
Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri isolat 6A3 dari spons *Xestospongia testudinaria* berdasarkan DNA parsial 16S rRNA. Angka pada percabangan adalah nilai *bootstrap* dengan 100 kali replikasi.



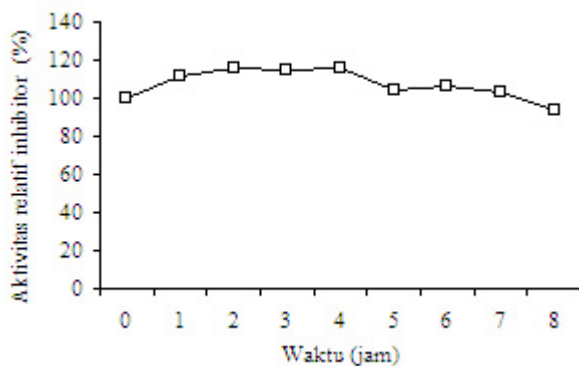
Gambar 3. Penentuan suhu optimum inhibitor protease *Chromohalobacter* sp. 6A3.



Gambar 4. Penentuan pH optimum inhibitor protease *Chromohalobacter* sp. 6A3.



Gambar 5. Penentuan ketahanan panas (10 menit) inhibitor protease *Chromohalobacter* sp. 6A3.



Gambar 6. Penentuan kestabilan panas (30 °C, pH 5) inhibitor protease *Chromohalobacter* sp. 6A3.

PEMBAHASAN

Koleksi spons dengan jenis yang berbeda pada penelitian ini dimaksudkan supaya didapat jenis inhibitor protease yang berbeda. Lee *et al.* (2001) menyatakan bahwa untuk jenis spons tertentu akan mengandung komponen bioaktif tertentu pula. Selain jenis spons yang berbeda, lokasi pengambilan spons juga berbeda, karena lingkungan atau habitat perairan akan sangat menentukan mikroorganisme yang hidup di lingkungan tersebut. Hal ini tentunya akan berpengaruh terhadap komponen bioaktif yang ada pada spons. Dengan demikian diharapkan juga akan didapatkan komponen bioaktif, dalam hal ini inhibitor protease, dengan jenis dan sifat yang berbeda pula.

Nurhayati *et al.* (2004) melaporkan bahwa di antara jenis spons yang dikumpulkan positif menghasilkan inhibitor terhadap protease *P. aeruginosa* dengan aktivitas tertinggi terdapat pada *Aplysina* sp. dan *P. nigra*. Sementara itu *J. stellifera* paling kuat menghambat protease *E. coli*. Protease *S. aureus* dihambat paling kuat oleh *J. stellifera* dan *Jaspis* sp. Lee *et al.* (2001) menyatakan bahwa *Jaspis* sp. dan *Xestospongia* sp. serta *A. aerophoba* mempunyai aktivitas biologis. *Xestospongia* sp. mempunyai aktivitas *vasoactive intestinal peptide* (VIP) inhibitor dan salah satu simbiotnya, yaitu *Micrococcus luteus* mempunyai aktivitas antimikroba.

Setelah diketahui bahwa keempat isolat positif menghasilkan inhibitor, maka keempat isolat tersebut dikarakterisasi. Hal yang menarik dari karakteristik tersebut adalah bahwa keempat isolat mampu tumbuh pada kisaran pH asam sampai basa. Ini berarti ada kemungkinan komponen bioaktif yang dihasilkan oleh isolat tersebut dapat aktif pada pH tersebut. Selain itu, di antara keempat isolat, isolat 6A3 merupakan bakteri halofilik. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi NaCl maksimum untuk pertumbuhannya yang mencapai 40%. Ventosa *et al.* (1998) dan Quillaguaman *et al.* (2004) melaporkan bahwa bakteri halofilik yang ditemukan baik dari jenis *Chromohalobacter* sp. maupun *Halomonas* sp. mampu tumbuh maksimum pada konsentrasi garam 30%, dan termasuk ke dalam moderat halofilik. Sementara itu isolat 6A3 yang berhasil ditemukan pada penelitian ini, mampu tumbuh pada konsentrasi yang lebih tinggi (40%). Keempat isolat yang diisolasi mampu mendegradasi gula sederhana (glukosa), namun tidak mampu mendegradasi gelatin.

Berdasarkan hasil pengujian secara kuantitatif dapat diketahui bahwa isolat 10A6, 6A3, dan 9A51 menghasilkan inhibitor protease pada fase stasioner (Tabel 5). Kondisi yang sama dapat dilihat pada *Serratia marcescens* yang mempunyai aktivitas inhibitor ekstraseluler tertinggi pada jam ke-18, dan aktivitas inhibitor intraseluler pada jam ke-12 (Kim *et al.* 1995). Begitu pula dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Murao *et al.* (1982), aktivitas inhibitor tertinggi yang dihasilkan oleh *Streptomyces rishiensis* adalah pada jam ke 24-36, yaitu pada fase menjelang stasioner. Hasil penelitian terhadap *Monascus purpureus* menunjukkan aktivitas inhibitor tertinggi pada hari ke-7 sampai ke-10, yaitu pada fase stasioner (Saruno *et al.* 1981). Kondisi yang berbeda terjadi pada isolat 1A12, aktivitas inhibitor terjadi pada fase logaritmik. Beberapa hasil penelitian yang lain menunjukkan hasil yang sama, seperti yang dilakukan oleh Imada *et al.* (1985a, b). *Alteromonas* sp. menghasilkan inhibitor marinostatin dengan aktivitas tertinggi pada jam ke-18 sampai ke-36 (Imada *et al.* 1985b).

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan 16S rRNA, ternyata isolat 6A3 termasuk genus *Chromohalobacter* sp. Hasil analisis parsial DNA tersebut menunjukkan kemiripan homologi sebesar 96% dari 386 nukleotida dengan gen 16S *Chromohalobacter* sp. MAN K24 dan juga dengan *Halomonas elongata*. Posisi isolat 6A3 pada pohon filogenetik menunjukkan nilai *bootstrap* sebesar 98% dengan *Chromohalobacter* sp. Is-Chi (Gambar 2).

Chromohalobacter sp. 6A3 selanjutnya ditumbuhkan untuk menghasilkan inhibitor protease. Komponen tersebut mempunyai suhu 30 °C dan pH optimum 5. Inhibitor protease memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitasnya akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu hingga mencapai suhu optimum. Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas menurun. Hames dan Hoper (2000) menyatakan bahwa suhu mempengaruhi laju reaksi inhibitor enzim (protein) melalui dua cara. Cara pertama adalah suhu akan meningkatkan laju reaksi inhibitor enzim sampai suhu optimum, namun pada suhu lebih tinggi akan terjadi pula perubahan konformasi enzim, sehingga mengalami

hambatan untuk memasuki sisi aktif inhibitor enzim sehingga menurunkan aktivitas inhibitor enzim. Cara kedua dengan peningkatan energi termal molekul yang membentuk struktur protein inhibitor enzim itu sendiri akan menyebabkan rusaknya interaksi nonkovalen sehingga inhibitor enzim mengalami denaturasi sehingga aktivitasnya menurun. Semua reaksi enzimatik sangat dipengaruhi oleh pH, sehingga diperlukan bufer dengan pH yang tepat supaya reaksi berjalan secara optimum. Inhibitor protease, yang merupakan protein tentunya mengikuti sifat-sifat protein yang mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun basa terutama pada gugus residu terminal karboksil dan terminal aminonya. Diperkirakan terjadinya perubahan aktivitas inhibitor protease akibat adanya perubahan ionisasi pada gugus ionik inhibitor baik pada sisi aktifnya maupun sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat enzim.

Dalam bentuk ekstrak kasar, inhibitor protease yang disimpan pada suhu 40 °C selama 10 menit, masih mempunyai aktivitas relatif tinggi (95.24%) sampai suhu 40 °C bila disimpan selama 10 menit. Pada penyimpanan dalam kondisi optimum, inhibitor protease stabil lebih lama yaitu sampai delapan jam (93.53%). Scopes (1987) menyatakan bahwa inhibitor enzim yang mengalami perubahan konformasi akan menyebabkan turunnya aktivitas. Disamping itu ada kemungkinan terjadi pemutusan ikatan-ikatan di dalamnya yang menyebabkan inhibitor tersebut tidak stabil pada suhu yang sedikit tinggi di atas suhu optimumnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Bersaing XI tahun anggaran 2003, atas nama Tati Nurhayati dan Maggy T. Suhartono.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn YB *et al.* 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Environ Microbiol* 69:4159-4166.
- Allen GR, Steene R. 1994. *Indo-Pasific Coral Reef Field Guide*. Singapore: Tropical Reef Reserach.
- Baehaki A. 2004. Karakteristik protease beberapa bakteri patogen [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, IPB.
- Cappucino JG, Sherman N. 1983. *Microbiology: A Laboratory Manual*. New York: Addison-Wesley Publ Comp.
- Elyakov GB *et al.* 1991. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia* 47:632-633.
- Flowers AE, Garson MJ, Webb RI, Dumdei EJ, Charan RD. 1998. Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res* 292:597-607.
- Hames BD, Hooper NM. 2000. *Biochemistry: The Instant Notes*. Ed ke-2. Hongkong: Springer-Verlag.
- Hammond JBW, Kruger. 1988. The Bradford method for protein quantitation. Di dalam: Walker JM (ed). *New Protein Technique*. New Jersey: Humana Pr. hlm 25-32.
- Imada C, Maeda M, Taga N. 1985b. Purification and characterization of the protease inhibitor "monostatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibition of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. *Bull Jap Soc Sci Fish* 51:1089-1094.
- Imada C, Simidu U, Taga N. 1985a. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. *Bull Jap Soc Sci Fish* 51:799-803.
- Imada C, Taga N, Maeda N. 1985c. Cultivation conditions for subtilisin inhibitor-producing bacterium and general properties of the inhibitor "marinostatin". *Bull Jap Soc Sci Fish* 51:805-810.
- Jenie BSL, Fardiaz S. 1989. *Uji Sanitasi dalam Industri Pangan: Petunjuk Laboratorium*. Bogor: PAU Pangan dan Gizi.
- Kim KS, Kim TU, Byun SM, Shin YC. 1995. Characterization of a metalloprotease inhibitor protein (SmaPI) of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol* 61:3035-3041.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 30:254-264.
- Mayer AMS, Lehmann VKB. 2000. Marine pharmacology. *Pharmacological* 42:62-69.
- Murao S, Kasai N, Kimura Y, Oda K. 1982. Isolation of metallo-proteinase inhibitor (FMPI) producing microorganism. *Agric Biol Biochem* 46:2697-2703.
- Nurhayati T, Suhartono MT, Suptijah P, Febrian I. 2004. *Screening inhibitor protease dari sponge, Kepulauan Seribu. Bul THP* VII:72-83.
- Oslarlit JM. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbiology* 78:7-16.
- Quillaguaman J, Delgado O, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. 2004. *Chromohalobacter sarencensis* a psychrotolerant moderate halophile isolated from the saline Andean region of Bolivia. *Intern J Syst Evol Microbiol* 54:1921-1926.
- Santosa DA. 2001. Rapid extraction and purification of environmental DNA for molecular cloning application and molecular diversity studies. *Molec Biotechnol* 17:59-64.
- Saruno R, Setoyama T, Nakashima C, Kato F, Murata A. 1981. Purification and some properties of nuclease inhibitor from *Monascus purpureus*. *Agric Biol Chem* 45:133-139.
- Scopes RK. 1987. *Protein Purification, Principles and Practice*. Ed ke-2. New York: Springer-Verlag.
- Stierle AC, Cardellina II JH, Singleton FL. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44:1021
- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Molec Biol Rev* 62:504-544.
- Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* 67:434-444.