KARAKTERISASI PROTEASE DARI BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Ace Baehaki*, Tati Nurhayati**, Maggy T. Suhartono***

Abstract

In the last decade, a concern on protease as medicinal target for overcoming bacterial and viral diseases has been rapidly increased because of the obvious involvement of this enzyme in the molecular of the diseases mechanism. The purpose of this research was to characterize proteases from fish patogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. The bacteria were grown in media containing triptone 1%, NaCl 1% and yeast extract 0,5%. The optimum production time of *A .hydrophila* was 48 h, the optimum pH was 7,5, the optimum temperature was 50 °C. Study on the effect of metals ion and spesific inhibitors indicated that protease from *A. hydrophila* was serin metaloprotease.

Keywords : protease, characterization, pathogenic bacteria

PENDAHULUAN

Bakteri patogen menghasilkan berbagai enzim yang pada dasarnya tidak toksik tetapi berperan penting dalam proses infeksi. Beberapa bakteri patogen memproduksi enzim hidrolitik seperti protease dan hialuronidase, yang mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inang. Enzim hidrolitik ini digunakan oleh bakteri untuk memperoleh sumber karbon dan energi dengan menghancurkan polimer inang menjadi gula sederhana dan asam amino (Salyers dan Whitt, 1994).

Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar. Keberadaan *Aeromonas* di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan senyawa organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen pada hewan aquatik berdarah dingin (Bullock *et al.*, 1971).

Infeksi bakteri *Aeromonas* bersifat sekunder yaitu bakteri akan masuk ke dalam tubuh ikan jika ada kerusakan jaringan yang disebabkan oleh kerusakan fisik atau kerusakan akibat serangan virus atau mikroorganisme lainnya (Angka, 1990). Nabib *et al.* (1989) menyatakan bahwa *Aeromonas* sp merupakan penyerang sekunder yang memperparah keadaan organisme.

* Staf Pengajar Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Palembang-Prabumulih Km 32 Inderalaya Sumatera Selatan
** Staf Pengajar Departemen Teknologi Hasil Perikanan, FPI K- IPB.
*** Staf pengajar Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB

Sifat patogen *Aeromonas* yang dikenal sebagai patogen oportunistik pada manusia dan ikan, melibatkan beberapa enzim ekstraseluler yang dilaporkan berkolerasi dengan mekanisme infeksi dan invasi bakteri tersebut (Rao *et al.*, 1998). Keterlibatan enzim bakteri patogen ini dalam mekanisme molekuler timbulnya berbagai penyakit memungkinkan untuk mencari dan mendesain inhibitor protease dalam rangka mencari peluang penemuan obat yang berhubungan dengan penyakit tersebut. Potensi yang besar pada mikroba dan sumber hayati lainnya sebagai penghasil inhibitor protease menyebabkan para peneliti mengkaji aspek tersebut. Dalam upaya pencarian/penapisan inhibitor protease tersebut, maka informasi karakteristik protease sebagai target menjadi sangat penting. Oleh karena itu perlu penelitian tentang produksi, pemurnian dan karakteristik dari protease *A. hydrophila.*

METODOLOGI PENELITIAN

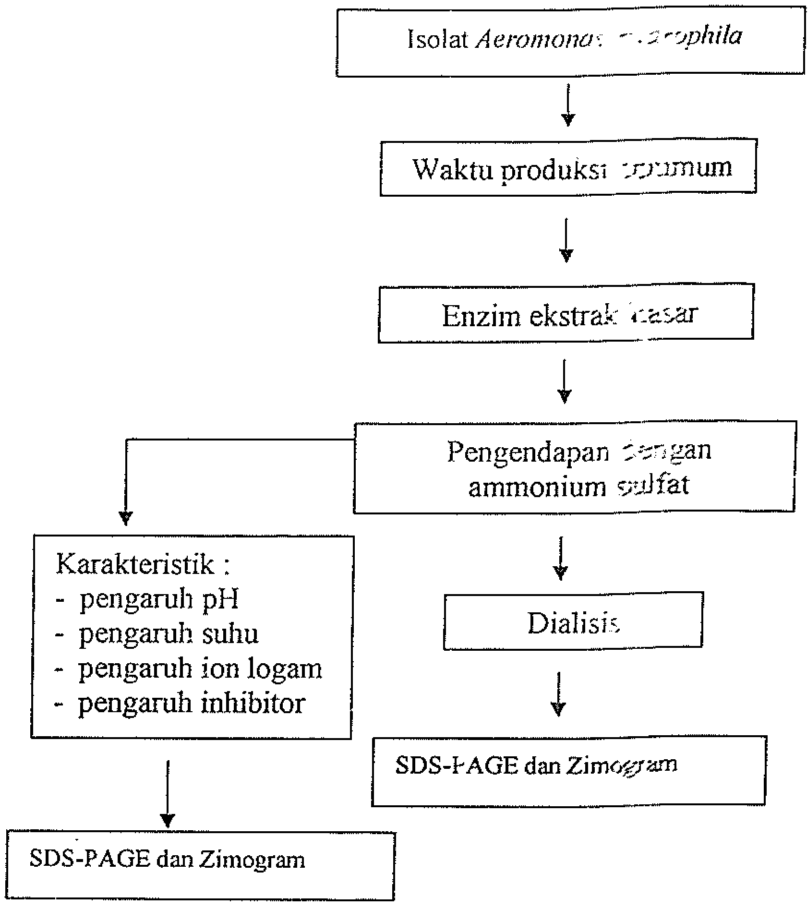
Bahan dan Alat

Bahan utama yang diperlukan adalah isolat bakteri *A. hydrophila* yang diperoleh dari Departemen Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bahan-bahan lain yang digunakan antara lain adalah media-media yang diperlukan untuk menumbuhkan dan pengayaan bakteri berturut-turut adalah *skim milk agar* (SMA) dan *luria bertani broth* (LB).

Alat-alat yang digunakan terdiri dari alat sentrifugasi, inkubator, effendorf, spektrofotometer dan kromatografi kolom.

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, meliputi produksi protease bakteri patogen, karakterisasi ekstrak kasar enzim protease, pengendapan ekstrak kasar enzim protease dengan ammonium sulfat dan penentuan berat molekul enzim protease dengan SDS-PAGE dan Zimogram. Diagram alir kegiatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir kegiatan penelitian

Penentuan waktu produksi enzim protease *A. hydrophila*

Proses diawali dengan menumbuhkan *A. hydrophila* selama 8 jam (*optical density* 0,8) dalam medium *luria bertani broth* (LB) pada suhu 37 °C, 120 rpm.. Sebanyak 10% inokulum tersebut dipindahkan ke dalam medium LB yang baru sebagai media untuk memproduksi protease kemudian diinkubasi selama 56 jam, pada suhu 37 °C, 120 rpm. Setiap 8 jam dilakukan pengukuran *optical density* (OD), dan aktivitas protease (Modifikasi Bergmeyer, 1983) sehingga diketahui waktu yang tepat untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas tertinggi.

Produksi enzim protease *A. hydrophila*

Produksi enzim protease dilakukan dengan menumbuhkan bakteri tersebut dalam media LB hingga OD=0,8. Selanjutnya sebanyak 10% inokulum tersebut ditumbuhkan dalam media LB yang baru lalu diinkubasi dengan menggunakan waktu terpilih, yaitu waktu yang tepat untuk menghasilkan enzim protease dengan aktivitas tertinggi, pada suhu 37 °C, 120 rpm. Pemisahan sel dilakukan dengan sentrifugasi berkecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung enzim diuji aktivitasnya menggunakan metode Bergmeyer (1983) pada media kasein hammarstein dan kadar proteinnya diukur menurut metode Bradford (1976). Selanjutnya supernatan diendapkan menggunakan ammonium sulfat.

Pengendapan dengan ammonium sulfat

Pada tahap ini supernatan diperlakukan dengan menambahkan ammonium sulfat pada konsentrasi yang berbeda, yaitu 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% dan 90%, kemudian dibiarkan selama satu malam pada suhu rendah (4 °C). Endapan protease dipisahkan dengan sentrifugasi 5000 rpm selama 40 menit lalu dilarutkan dengan buffer Tris-HCl 10 mM pH 8. Analisis yang dilakukan adalah pengukuran aktivitas protease dengan metode Bergmeyer (1983) pada substrat kasein hammarstein dan penentuan kadar protein menurut metode Bradford (1976).

Karakterisasi enzim protease ekstrak kasar

Karakterisasi yang dilakukan meliputi penentuan pH optimum, suhu optimum, pengaruh ion logam, pengaruh inhibitor spesifik. Analisis yang dilakukan adalah aktivitas protease dan kadar protein. Selain itu dilakukan penentuan berat molekul enzim protease dengan SDS-PAGE dan zimogram. Variasi pH yang digunakan adalah 4, 5, 6, 7, 8 9, dan 10. Variasi suhu yang digunakan adalah 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C dan 70 °C. Ion logam yang digunakan adalah $CaCl_2$, KCl, NaCl, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $BaCl_2$, $ZnCl_2$, dan $FeCl_2$ dengan konsentrasi masing-masing 1 dan 5 mM. Sedangkan inhibitor yang digunakan adalah *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) dan *phenyl methane sulfonyl fluoride* (PMSF) dengan konsentrasi 1 dan 5 mM.

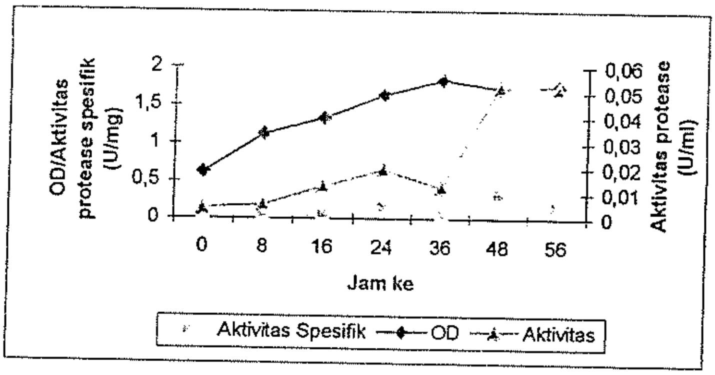
Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli, 1970) dengan konsentrasi akrilamid 8% w/v. *Running* elektroforesis menggunakan arus 50 mA serta voltage 100 volt. Marker yang digunakan Phosphorilase b (97 kD), albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD), carbonic anhydrase (30 kD), tripsin inhibitor (20,1 kD) dan α-Laktalbumin (14,4 kD) (Pharmacia). Metode pewarnaan yang digunakan adalah metode *silver staining*.

Zimogram dilakukan dengan metode SDS PAGE, hanya pada gel pemisah ditambah dengan substrat kasein hammerstein (modifikasi metode Garnelli-Piperno dan Reich 1978). Renaturasi dilakukan merendam gel dalam larutan Triton X-100 selama 1 jam, kemudian dilakukan inkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8, selama 24 jam. Pewarnaan dilakukan dengan *coomassie blue.*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Produksi Protease yang Optimum

Pada tahap ini dilakukan pengukuran OD dan aktivitas protease guna mendapatkan waktu yang optimum. Waktu produksi protease yang optimum protease dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Waktu produksi protease yang optimum *A. hydrophila*

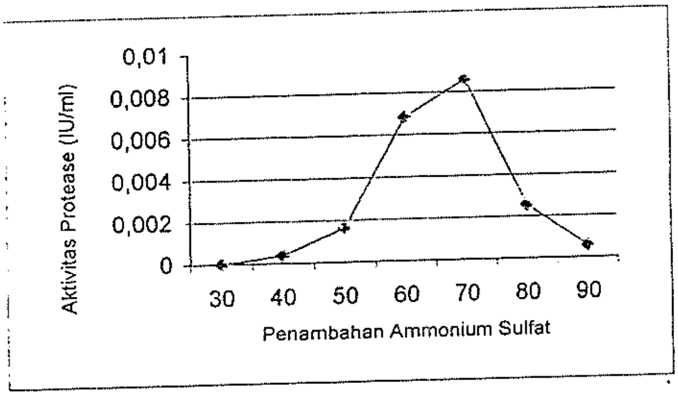
Protease *A. hydrophila* memiliki waktu inkubasi dengan aktivitas tertinggi yaitu pada inkubasi selama 48 jam (0,0524 IU/ml) dan aktivitas protease spesifik 1,54 U/mg. Protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas maksimum pada fase menjelang stasioner.

Pengendapan dengan Ammonium Sulfat

Prinsip pengendapan dengan ammonium sulfat adalah *salting out* yaitu dengan meningkatkan kekuatan ion sehingga akan menyebabkan molekul air mengelilingi protein terlepas dan terikat oleh garam (Walker, 1992).

Proses pengendapan akan lebih sempurna bila filtrat enzim yang telah ditambahkan dengan ammonium sulfat dibiarkan semalam pada suhu 4^0C Endapan yang diperoleh yaitu berupa enzim dan protein lain (Richardson dan Hyslop, 1985).

Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui bahwa aktivitas tertinggi untuk protease *A. hydrophila* yaitu pada penambahan ammonium sulfat 70% dengan nilai aktivitas protease 0,0086 U/ml dan aktivitas protease spesifik 2,07. Dengan demikian, pengendapan dengan ammonium sulfat meningkatkan derajat kemurnian sebanyak 1,3 kali.



Gambar 3. Pengaruh penambahan ammonium sulfat terhadap aktivitas protease *A. hydrophila*

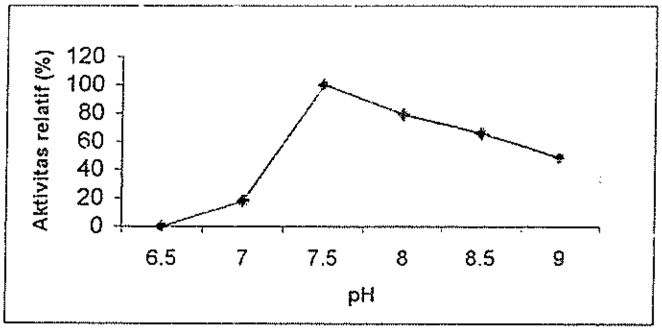
Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar

Karakterisasi protease meliputi penentuan suhu optimum, pH optimum, pengaruh penambahan senyawa kation dan penghambat aktivitas protease, dan penentuan berat molekul.

Pengaruh pH

Aktivitas enzim bervariasi dengan adanya perubahan pH. Diperkirakan perubahan keaktifan enzim akibat perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim, pada sisi aktifnya atau sisi lain yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif. Gugus ionik berperan dalam menjaga konformasi sisi aktif dalam mengikat substrat dan dalam mengubah substrat menjadi produk. Perubahan ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, yang juga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Muhtadi *et al.*, 1996). Pada skala deviasi pH yang besar, perubahan pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi sehubungan dengan adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Hames dan Hooper, 2000).

Enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH yang disebut pH optimum, pada umumnya berkisar antara pH 4,5 sampai 8,0; namun enzim tertentu mempunyai kisaran pH yang sempit. Di sekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi (Muhtadi *et al.*, 1996).



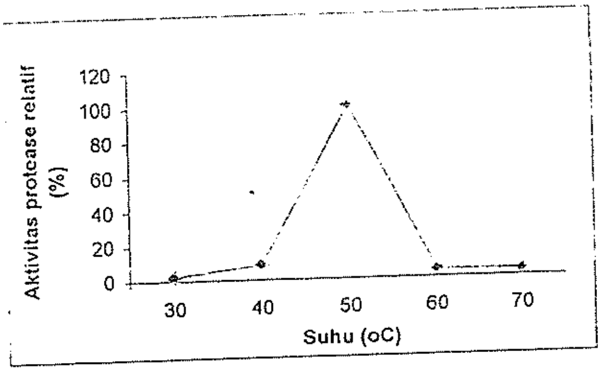
Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease *A. hydrophila*

Protease *A. hydrophila* mempunyai pH optimum 7,5 (Gambar 4). pH optimum enzim *A. hydrophila* menurut Esteve dan Birbeck (2004) adalah 8. pH optimum akan tercapai bila terjadi kesesuaian konformasi antara sisi katalitik enzim dengan substrat. Hal ini dipengaruhi oleh pK dari gugus yang terionisasi pada sisi aktif enzim yang berperan mengikat substrat, pK gugus molekul substrat yang terikat anzim dan pK gugus fungsional enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik (Thenawidjaja, 1988).

Pengaruh suhu

Pada umumnya setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu. Tetapi setelah suhu optimum tercapai, maka kenaikan suhu menyebabkan aktivitas enzim menurun.

Hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai suhu seperti terlihat pada Gambar 5. Berdasarkan Gambar 5 dapat diketahui bahwa aktivitas tertinggi pada protease *A. hydrophila* pada suhu inkubasi 50 °C.



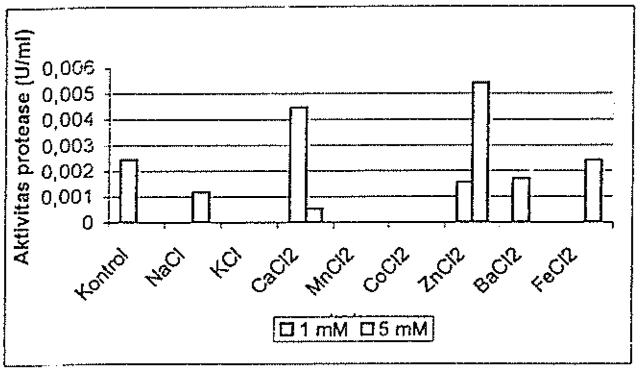
Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas protease *A. hydrophila*

Suhu mempengaruhi laju reaksi katalisis enzim dengan dua cara. Pertama, kenaikan suhu akan meningkatkan energi molekul substrat dan pada akhirnya meningkatkan laju reaksi enzim. Peningkatan suhu juga berpengaruh terhadap perubahan konformasi substrat sehingga sisi aktif substrat mengalami hambatan untuk memasuki sisi aktif enzim dan menyebabkan turunnya aktivitas enzim. Kedua, peningkatan energi termal molekul yang membentuk struktur protein enzim itu sendiri akan menyebabkan rusaknya interaksi-interaksi non kovalen (ikatan hidrogen, ikatan van der walls, ikatan hidrofobik dan interaksi elektrostatik) yang menjaga struktur 3 dimensi enzim secara bersama-sama sehingga enzim mengalami denaturasi. Denaturasi menyebabkan struktur lipatan enzim membuka pada bagian permukaannya sehingga sisi aktif enzim berubah dan terjadi penurunan aktivitas enzim (Hames dan Hooper, 2000).

Pada suhu yang lebih rendah dari suhu optimum, aktivitas enzim juga rendah, hal ini disebabkan karena rendahnya energi aktivasi yang tersedia. Energi tersebut dibutuhkan untuk menciptakan kondisi tingkat kompleks aktif, baik dari molekul enzim atau molekul substrat.

Pengaruh Ion logam

Beberapa enzim membutuhkan ion logam sebagai kofaktor untuk mendukung efisiensi katalitik enzim. Logam tersebut membantu reaksi katalitik dengan cara mengikat substrat pada sisi pemotongan. Selain berperan dalam pengikatan antara enzim dengan substrat, beberapa logam juga dapat mengikat enzim secara langsung untuk menstabilkan konformasi aktifnya atau menginduksi formasi situs pengikatan atau situs aktif suatu enzim (Devlin, 1982).



Gambar 6. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease *A. hydrophila*

Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui bahwa logam yang bertindak sebagai aktivator adalah Ca^{+} (1 mM) dan Zn^{2+} (5 mM), sedangkan yang berperan sebagai penghambat adalah Na^{+}, K^{+}, Mn^{2+} Co^{2+} (1 dan 5 mM) dan Fe^{3+} (1 mM).

Pengaruh inhibitor spesifik

Protease memiliki kemampuan menghirolisis substrat, maka *Nomenclature Commite of International Union of Biochemistry and Moleculer Biology* menggolongkan enzim ke dalam hidrolase. Sedangkan para ahli menggolongkan protease berbeda-beda. Berdasarkan mekanisme reaksi yang dikatalisis, endopeptidase dapat dikelompokkan menjadi empat yaitu protease serin, protease aspartat, protease sistein, dan protease logam.

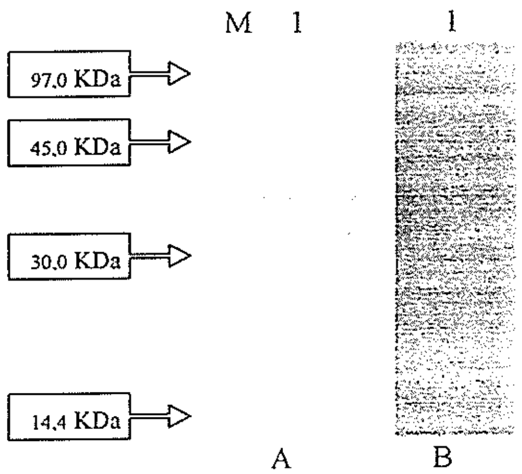
Dalam penelitian ini penggolongan protease hasil produksi dilakukan dengan cara mereaksikan dengan senyawa-senyawa inhibitor atau aktivator spesifik, seperti PMSF yang merupakan inhibitor spesifik untuk protese serin dengan mengubah pada sisi aktif enzim menjadi derivat *phenyl methyl sulfonyl* dan EDTA yang merupakan senyawa pengkelat ion logam.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa PMSF dan EDTA sudah menghambat 100% aktivitas protease *A. hydrophila* mulai konsentrasi rendah (1 mM). Oleh karena itu protease *A. hydrophila* dapat digolongkan sebagai protease serin metaloprotease.

Penelitian lain yang dilakukan pada aminopeptidase dari *Aeromonas caviae*T-64 menunjukkan enzim ini dihambat oleh o-phenanthrolin dan EDTA, sehingga hasil ini mengindikasikan sebagai metaloenzim (Noboru *et al.*, 1997).

Penentuan berat molekul

Penentuan berat molekul dilakukan terhadap protease *A. hydrophila* ekstrak kasar dan hasil pengendapan menggunakan ammonium sulfat dengan teknik SDS-PAGE. Melalui metode ini molekul protein, akan terpisah berdasarkan berat molekul. Hasil analisis menggunakan SDS PAGE dan zymogam dapat dilihat pada Gambar 7.

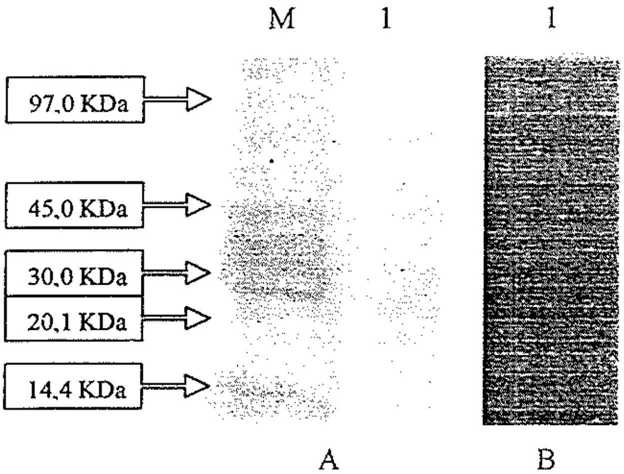


Gambar 7. Hasil SDS *silver staining* (A) dan zimogram (B) aktivitas protease ekstrak kasar protease *A. hydrophylla* (M = Marker, 1 = *A. hydrophylla*)

Penentuan berat molekul ditentukan berdasarkan kurva standar dengan persamaan Y= 1,9551-1,068X dimana Y= log berat molekul marker (kDa), sedangkan X= mobilitas relatif protein (cm). Berdasarkan analisa tersebut diketahui bahwa ekstrak kasar pada protease *A. hydrophila* didapatkan 4 pita yaitu 51,8 kD, 35 kD, 26,7 kD dan 19,8 kD (Gambar 7A).

Pada penelitian ini juga dilakukan zimogram untuk mengetahui berat molekul yang berperan sebagai protease. Zimogram dilakukan dengan menggunakan substrat kasein. Hasil zimogram (Gambar 7B) menunjukkan *A. hydrophila* memiliki berat molekul yaitu 35 kD.

Hasil SDS PAGE untuk protease hasil pengendapan dengan ammonium sulfat terdapat pada Gambar 8. Penentuan berat molekul ditentukan berdasarkan kurva standar dengan persamaan Y= 2,0595-1,1297X dimana Y= log berat molekul marker (kDa), sedangkan X= mobilitas relatif protein (cm). Berdasarkan analisa tersebut diketahui bahwa ekstrak kasar pada protease *A. hydrophila* didapatkan 8 pita yaitu 81,7 kD, 46,2kD, 32 kD, 17,1 kD, 14,8 kD, 12,3 kD, 11,2 kD dan 10,2 kD (Gambar 8A).



Gambar 8. Hasil SDS silver (A) dan Zimogram (B) aktivitas Protease *A. hydrophila* setelah Pengendapan (M=Marker, 1=*A. hydrophila*).

Zimogram hasil pengendapan ammonium sulfat (Gambar 8B) menunjukkan protease *A. hydrophila* memiliki 1 pita yang berukuran 35 kD. Sementara itu penelitian lain yang dilakukan oleh Esteve dan Birbeck (2004) menunjukkan bahwa protease utama yang dipisahkan dari kultur supernatan *A. hydrophila* E063 dengan iso elektroforesis merupakan protease serin dengan berat molekul 68 kD, pita protein yang lain (60, 44 dan 31 kD) memperlihatkan metaloprotease termostabil. Sementara itu penelitian Noboru *et al.* (1997) aminopeptidase dari *A. caviae* T-64 dengan menggunakan MALDI-TOF *mass Spectrometry* dan SDS-PAGE masing-masing berukuran 29,5 dan 31 kD.

KESIMPULAN

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri patogen yang memproduksi protease dengan waktu produksi optimum 48 jam. Pengendapan dengan ammonium sulfat menunjukkan protease *A. hydrophila* mempunyai aktivitas tertinggi pada pengendapan ammonium sulfat 70%. pH optimum bakteri ini adalah 7,5, suhu optimum 50 °C dan digolongkan serin metaloprotease. Analisa berat molekul dengan zimogram menunjukkan bahwa protease tersebut memiliki berat molekul sekitar 35 kD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Dikti yang telah mengusahakan dana untuk penelitian ini melalui HIBAH BERSAING XI atas nama Tati Nurhayati dan Maggy T. Suhartono. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Lembaga Penelitian IPB yang memungkinkan penelitian ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

Angka SL, 1990. Penyakit ikan akibat bakteri. Balai Penataran dan Latihan Pertanian (BPLP) Bogor. 18 hal.

Bergmeyer HU, J Bergmeyer , dan M Graβl. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Weinheim : Verlag Chemie. Halm 1007-1009.

Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive methods for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72:234-254.

Bullock GL, DA Conroy, dan SF Sniezko. 1971. Bacterial disease of Fish, Book 2A. In Sniezko and Axelord (Eds) Disease Fish. T.F.H. Publisation. England.

Esteve C dan Birbeck TH. 2004. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). J Appl Microbiol. 96:994-1001.

Devlin TM. 1982. Textbook of Biochemistry with clinical correlation. John Wiley and Sons. Canada.

Hames BD dan Hooper NM. 2000. Biochemistry: The Instant Notes. Ed.ke-2. Hongkong:Springer-Verlag.

Granelli-Pipemo A dan Reich E. 1978. A study of protease and protease-inhibitor complexes in biological fluids. J. Exp. Med. 148:223-234.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophag T4. Nature 227:680-685.

Muhtadi D, Palupi NS dan Astawan M. 1996. Enzim dalam Pangan. PAU Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Nabib R, Pasaribu H dan Fachriyan. 1989. Patologi dan Penyakit Ikan. Depdikbud. Ditjen Dikti. PAU Biotek. IPB.

Noboru I, I Satoru, T Tadayuki, O Kiyoshi dan H Kiyoshy. 1997. Purification and characterization of *Aeromonas caviae* aminopeptidase processing debittering activity. J. of Agri. and Food Chem. 45:4897-4902.

Rao MM, AM Tanksale, MS Gatge, dan VV Desphande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 62:597-635.

Richardson T, dan DB Hyslop. 1998. Enzyme. *Dalam* O.R. Fennema (Ed). Food Chemistry. Mac Kerel Bekker, Inc. New York.

Salyers AA, dan DD Whitt. 1994. Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. Department of Microbiology. University of Illinois. ASM Press, Washington D.C.

Thenawijaya M. 1988. Dasar-dasar Biokimia. Jilid I, Penerbit Erlangga. Jakarta

Walker JM. 1992. Analysis of amino acids, proteins, and nucleic acids. Thames Polytechnic Eltham. London.