KARAKTERISTIK PROTEASE DARI BAKTERI PATOGEN *Staphylococcus epidermidis*

Ace Baehaki [1], Tati Nurhayati [2] dan Maggy T. Suhartono [3]

Abstrak

Beberapa bakteri patogen memproduksi enzim hidrolitik seperti protease dan hialuronidase yang berfungsi untuk mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inang. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan karakterisasi protease dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang diisolasi dari koleksi Rumah Sakit Pertamina Jakarta. Bakteri ditumbuhkan pada media Luria broth (LB) yang mengandung *tryptone* 1 %, NaCl 1 % dan *yeast extract* 0,5 %. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa protease *S. epidermidis* ini memiliki pH dan suhu optimum 8 dan 50 ^{o}C. Ion logam Mn^{2+} (5 mM) dan Ba^{2+} (5 mM) merupakan aktivator kuat protease *S. epidermidis* yang dapat meningkatkan aktivitas protease masing-masing 3 dan 2 kali lipat dari protease kontrol, sedangkan Na^{+} (1 mM), K^{+} (1 mM), Fe^{3+} (1 dan 5 mM), Zn^{2+} (5 mM), dan Ca^{2+} (1 mM) merupakan inhibitor ion logam yang kuat. Protease *S. epidermidis* digolongkan ke dalam serin metaloprotease karena dapat dihambat secara sempurna oleh PMSF dan EDTA. Protease tersebut mempunyai berat molekul sekitar 35 kD.

Kata Kunci: bakteri patogen, karakterisasi, protease*,* *Staphylococcus epidermidis*.

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 berfungsi untuk 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).

Bakteri *Staphylococcus* dapat menyebabkan sakit melalui kemampuannya berkembang biak dan menyebar secara luas dalam jaringan dan pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Beberapa zat ini adalah enzim, sedangkan yang lain diduga berupa toksin (Jawetz *et al.* 1996). Bakteri *Staphylococcus* menghasilkan

[1] Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya
[2] Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK IPB
[3] Departemen Teknologi Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor, Bogor

protease ekstraseluler jenis metaloprotease yang bersifat toksik (Hase dan Finklestein 1993).

Mengingat pentingnya protease dalam mekanisme penyebab penyakit, maka saat ini perhatian para peneliti terhadap protease sebagai target obat sangat besar. Oleh karena itu informasi tentang karakteristik protease tersebut amat diperlukan karena akan memudahkan bagi kita untuk mengupayakan mencari penghambat (inhibitor) enzim tersebut. Sebagai sumber inhbitor dapat berasal dari organisme laut, seperti sponge atau dari simbionnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan karakterisasi protease dari bakteri patogen yaitu bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Bahan utama berupa isolat bakteri patogen *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari koleksi Rumah Sakit Pertamina Jakarta.

Produksi Protease

Galur bakteri patogen diinokulasi sebanyak 1-2 lup pada media luria broth (LB). Proses diawali dengan penentuan umur prekultur (dalam media LB) yang tepat untuk keperluan produksi enzim. Pengamatan dilakukan dengan mengukur *optical density* (OD) sampai nilai OD = 0,8 pada λ = 620 nm. Sebanyak 10 % media *luria broth* (LB) yang sudah mempunyai OD = 0,8 ditambahkan pada media LB yang baru dan selanjutnya nilai OD dan aktivitas protease diukur setiap 8 jam selama 56 jam.

Pengukuran Aktivitas Protease dan Kadar Protein

Aktivitas protease diukur dengan metode Bergmeyer *et al.* (1983) menggunakan substrat kasein (Hammerstein 2 %) (b/v). Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu µmol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) dengan menggunakan Bovine Serum Albumin Fraction V sebagai standar protein.

Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar

Pengujian karakterisasi protease yang dilakukan meliputi pengaruh pH (6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 dan 9), suhu (30 , 40, 50, 60, dan 70 ^{0}C), ion logam (Na^+, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, dan Ba^{2+}) dan inhibitor spesifik (EDTA dan PMSF).

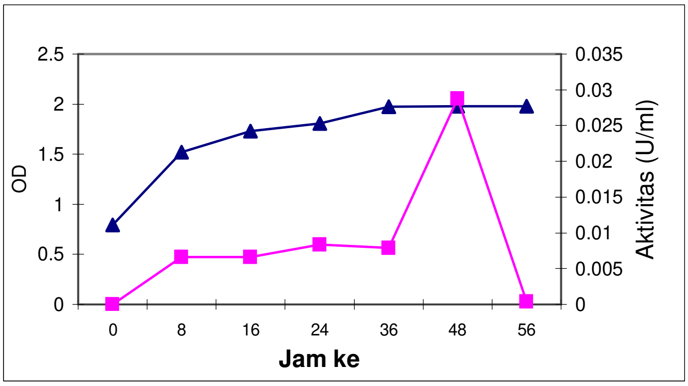
SDS PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli 1970), sedangkan zimogram menggunakan modifikasi metode Choi *et al*. (2001). Analisis zymogram dilakukan dengan cara: gel akrilamid 8 % dikopolimerisasi dengan substrat kasein 2 %. Setelah dilakukan elektroforesis, gel direndam dengan Triton X-100 2,5 % selama 1 jam dan dilakukan inkubasi dalam buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8 selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pewarnaan coomassie blue. Penentuan berat molekul dengan SDS PAGE dilakukan dengan pewarnaan *silver staining*. Pewarnaan dengan *silver staining* dilakukan sebagai berikut: gel direndam dalam larutan fiksasi (25 % metanol dan 12 % asam asetat) selama 1 jam kemudian direndam dalam 50 % etanol selama 20 menit, kemudian diganti dengan 30 % etanol selama 2 x 20 menit. Larutan diganti dengan *enhancer*, kemudian dicuci dengan akuadestilata. Larutan silver nitrat ditambahkan selama 30 menit, kemudian dicuci lagi dengan akuadestilata 2 x 20 detik dan ditambahkan larutan campuran Na_2CO_3, formaldehida dan terakhir dengan larutan fiksasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Protease

Produksi protease dilakukan pada media *luria broth* (LB) yang dikultur dalam medium yang sama hingga mencapai OD=0,8. Pengamatan dilakukan setiap 8 jam sekali selama 56 jam, pada suhu 37 ^{0}C dan kecepatan 120 rpm. Enzim yang telah dihasilkan oleh bakteri dipisahkan dari sel bakteri menggunakan sentrifugasi. Dengan teknik ini, sel akan mengendap oleh adanya gaya gravitasi sedangkan enzim tetap terdapat pada supernatan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan struktur enzim, selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas protease, sedangkan pertumbuhan bakteri diamati melalui *optical density* (OD) pada λ= 620 nm. Waktu produksi protease yang optimum dari bakteri patogen ini dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Produksi protease *S. epidermidis* (-▲- Pertumbuhan bakteri, -■- aktivitas protease).

Protease *S. epidermidis* memiliki aktivitas tertinggi (0,0288 U/ml) setelah diinkubasi selama 48 jam dalam media LB, protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase stasioner (Gambar 1). Bakteri *S. epidermidis* menghasilkan protease pada saat pertumbuhan bakteri menjelang stasioner. Hal ini menunjukkan bakteri ini memerlukan protease sebagai strategi bakteri dalam mempertahankan hidupnya. Penelitian tentang produksi optimum protease yang dilakukan oleh Fawzya (2002) menunjukkan bahwa isolat bakteri asal ikan hiu (*Carcharhinus limbatus*) menghasilkan protease optimal pada jam ke-24, pada saat pertumbuhan bakteri mulai mencapai fase stasioner. Selain itu, dilaporkan pula bahwa protease yang dihasilkan oleh *Vibrio proteolyticus* memiliki produksi yang optimal pada fase stasioner (Durham 1990).

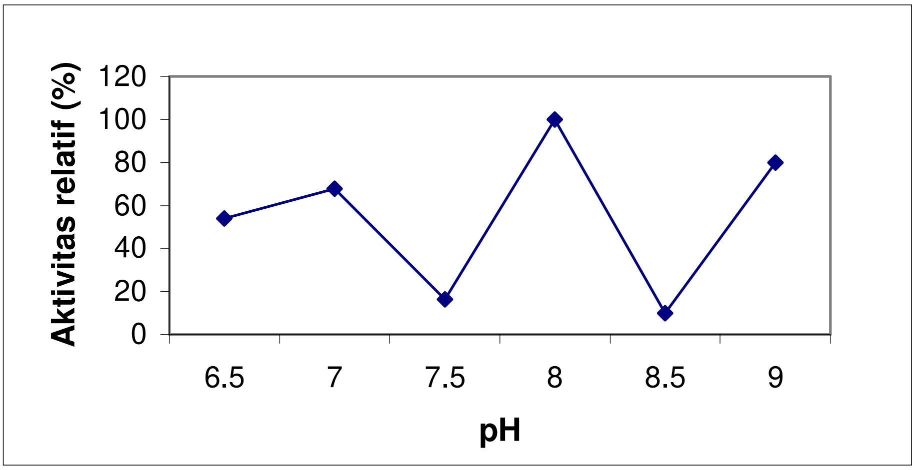
Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar

Karakterisasi protease yang dilakukan meliputi penentuan suhu dan pH optimum, pengaruh kation dan inhibitor spesifik serta penentuan berat molekul.

Keasaman (pH) Optimum

Semua reaksi enzimatis dipengaruhi pH, sehingga diperlukan bufer untuk mengontrol pH reaksi. Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Diperkirakan perubahan keaktifan enzim adalah sebagai akibat perubahan ionisasi pada gugus ionik enzim, baik 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 (Muchtadi *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 3D enzim (Hames dan Hooper 2000).

Gambar 2 memperlihatkan pengaruh pH terhadap aktivitas protease kasar bakteri patogen, pH optimum *S. epidermidis* pada pH 8, sedangkan menurut penelitian Drapeau *et al.* (1972) pH optimum dari protease ini adalah 7,6.

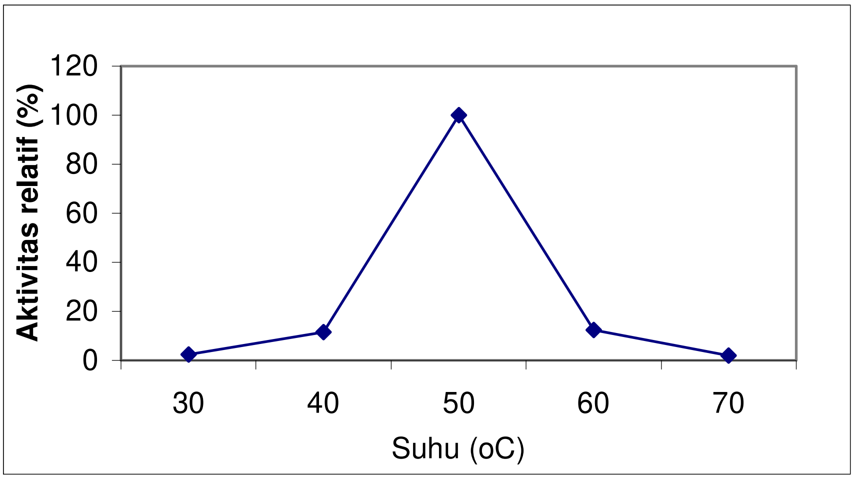


Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease *S. epidermidis*

Pada Gambar 2, terlihat terjadi naik turun dengan berbedanya pH, hal ini dipengaruhi oleh pK dari gugus yang terionisasi pada sisi aktif enzim yang berperan mengikat substrat, pK gugus molekul substrat yang terikat enzim dan pK gugus fungsional enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivitas katalitik (Thenawidjaja 1988).

Suhu Optimum

Pada umumnya setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai, kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun. Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim pada berbagai suhu (Gambar 3), terlihat bahwa aktivitas tertinggi protease *S. Epidermidis* diperoleh pada suhu inkubasi 50 ^{0}C.



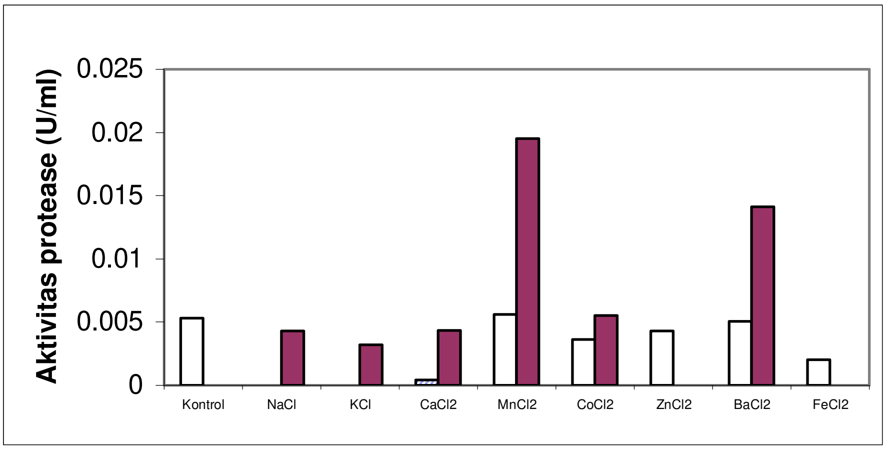
Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas *S. epidermidis*

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 3D 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.

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas dengan penambahan ion logam pada substrat kasein (Gambar 4), ion logam Mn^{2+} (5 mM) dan Ba^{2+} (5 mM) merupakan aktivator kuat protease *S. epidermidis*, yang dapat meningkatkan aktivitas protease masing-masing 3 dan 2 kali lipat dari protease kontrol, sedangkan inhibitor ion logam yang kuat adalah Na^{+} (1 mM), K^{+} (1 mM), Fe^{3+} (1 dan 5 mM), Zn^{2+} (5 mM), dan Ca^{2+} (1 mM).



Gambar 4. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas protease *S. epidermidis*

Adanya peningkatan keaktifan karena penambahan logam tertentu menunjukkkan bahwa ion logam diperlukan sebagai komponen dalam sisi aktif enzim. Mekanisme ion logam dalam memperbesar aktivitas enzim melaui yaitu (a) menjadi bagian integral dari sisi aktif, (b) merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatis, (c) merubah muatan listrik, (d) mengusir ion inhibitor, (e) menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat. Penghambatan ion logam terhadap aktivitas protease pada konsentrasi tertentu berkaitan dengan kekuatan ion, dimana kekuatan ion itu sendiri mempengaruhi konformasi atau struktur tiga dimensi dari protein enzim atau protein substrat. Pada konsentrasi tertentu ion logam tertentu dapat bertindak sebagai inhibitor, tetapi dapat juga bertindak sebagai aktivator pada konsentrasi berbeda (Richardson dan Hyslop 1985).

Pengaruh Inhibitor Spesifik

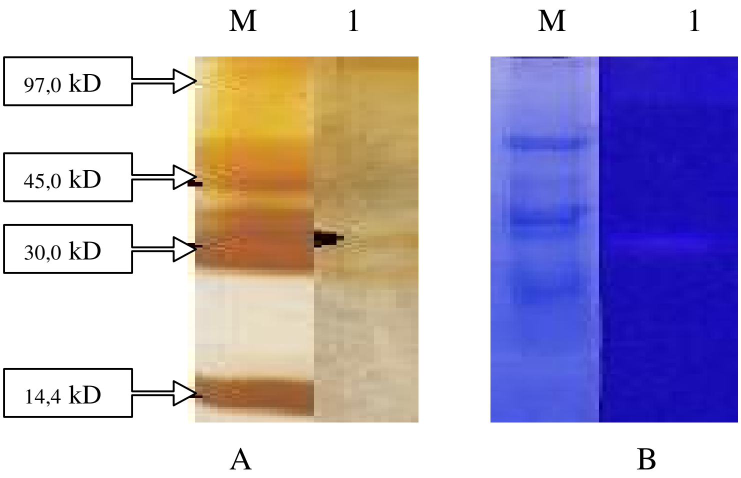
Protease memiliki kemampuan menghidrolisis substrat. Oleh karena itu enzim protease digolongkan ke dalam enzim hidrolase. Berdasarkan mekanisme reaksi yang dikatalisis, protease dapat dikelompokkan menjadi empat, yaitu protease serin, protease aspartat, protease sistein dan protease logam.

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa aktivitas protease *S. epidermidis* dihambat sempurna oleh inhibitor protease serin yaitu PMSF, dan juga dihambat oleh EDTA, sehingga dapat disimpulkan bahwa protease tersebut digolongkan ke dalam serin metaloprotease. Teufel dan Gotz (1993) menggolongkan protease *S. epidermidis* sebagai metaloprotease.

Perkiraan Berat Molekul dengan SDS-PAGE dan Zimogram

Penentuan berat molekul dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfat-poliakrilamida gel elektroforesis), yang merupakan metode yang sudah digunakan secara luas.

Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE pada ekstrak kasar protease *S. epidermidis* didapatkan 2 pita yaitu 35 kD dan 26,7 kD sedangkan hasil zimogram menunjukkan pita yang berukuran 35 kD (Gambar 2). Protease *S. aureus* menurut penelitian Drapeau (1978) memiliki berat molekulnya 27 kD.



Gambar 5. Hasil SDS *silver staining* dan Zimogram aktivitas protease ekstrak kasar (A dan B) (M=Marker, 1= *S. aureus*).

KESIMPULAN

Protease *S. epidermidis* memiliki aktivitas tertinggi (0,0288 U/ml) setelah diinkubasi selama 16 jam dalam media LB. Protease diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel dan mencapai aktivitas tertinggi pada fase menjelang stasioner. Karakterisasi protease *S.epidermidis* ini adalah memiliki pH optimum 8, suhu optimum pada suhu 50 ^{0}C. Ion logam Mn^{2+} (5 mM) dan Ba^{2+} (5 mM) merupakan aktivator kuat protease *S. epidermidis*, yang dapat meningkatkan protease masing-masing 3 dan 2 kali lipat dari protease kontrol. Sedangkan inhibitor ion logam yang kuat adalah Na^+ (1 mM), K^+ (1 mM), Fe^{3+} (1 dan 5 mM), Zn^{2+} (5 mM), dan Ca^{2+} (1 mM). Protease *S. epidermidis* digolongkan sebagai serin metaloprotease karena dapat dihambat secara sempurna oleh PMSF dan EDTA. Berat molekul ditentukan dengan menggunakan SDS-PAGE dan zimogram didapatkan berat molekul sekitar 35 kD.

DAFTAR PUSTAKA

Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., . Graβl M. 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* Vol 2. Weinheim : Verlag Chemie. hal 1007-1009.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem,* 72:234-254.

Choi N.S., Yoon KS, Lee JY, Han KY, Kim SH. 2001. Comparison of three substrates (casein, fibrin, and gelatin) in zimographic gel. *J Biochim Mol Biol 34:531-536.*

Drapeau G. 1978. The Primary Structure of *Staphylococcal* Protease. *Can J Biochem, 56: 534.*

Drapeau G, Boily Y, Houmard J. 1972. Purification and Properties of an Extracellular Protease of *Staphylococcus aureus. J Biol Chem 247(20): 6720-6726.*

Durham DR. 1990. The unique stability of *Vibrio proteolyticus* neutral protease under alkaline conditions affords a selective step for purification and use in amino acid-coupling reaction. *Appl. Environ. Microbiol. 56:2277-2281.*

Fawzya YN. 2002. *Karakterisasi protease ekstraseluler dari isolat bakteri asal ikan hiu atas (Carcharhinus limbatus)".* [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Hames BD, Hooper NM. 2000. Biochemistry: The Instant Notes 2nd ed. Hongkong: Springer-Verlag. p83-84.

Hase CC, Finkelstein R. 1993. Bacterial extracelluler zinc-containing metalloprotease. *Microbiol Reviews 57(4):823-837.*

Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. 1996. *Medical Microbiology.* Alih bahasa Edi Nugroho, R.F. Maulany. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.

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

Mayer AMS dan Lehmann VKB. 2000. *Marine pharmacology.* The Pharmacological. 42(2):62-69.

Muchtadi D, Palupi NS, Astawan M. 1996. *Enzim dalam Industri Pangan.* Bogor: PAU Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor.

Richardson T, Hyslop DB. 1985. Enzyme. *Di dalam* Fenema OR (Ed), Food Chemistry. New York: Mac Kerel Bekker, Inc.

Salyers AA, Whitt DD. 1994. *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach.* Department of Microbiology University of Illinois. Washington DC: ASM Press.

Teufel P, Gotz F. 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis. J. Bacteriol. 175(13):4218-4224.*

Thenawidjaya M. 1988. Dasar-dasar Biokimia Jilid I. Jakarta: Penerbit Erlangga