MODIFIKASI MEDIA *MARINE BROTH* PADA PRODUKSI INHIBITOR PROTEASE DARI BAKTERI *Acinetobacter baumanni* YANG HIDUP BERSIMBIOSIS DENGAN SPONGE *Plakortis nigra*

Desniar[1], Tati Nurhayati[1], Maggy T. Suhartono [2] , Eko Muhammad Isa[3],

Abstrak

Enzim protease memiliki peranan penting dalam proses metabolisme bakteri patogen. Protease bakteri tersebut dapat dihambat aktivitasnya oleh inhibitor protease. Iinhibitor protease dapat diproduksi dari bakteri *Acinetobacter baumanni* yang hidup bersimbiosis dengan sponge laut (*Plakortis nigra*). Agar produksi inhibitor protease dapat lebih optimal maka perlu diketahui komposisi media *marine broth* yang baik. Perlakuan yang digunakan pada penelitian ini adalah modifikasi konsentrasi *peptone* (0,5 % dan 1 %) dan modifikasi konsentrasi *yeast extract* (0,1 %; 0,5 % dan 1 %). Peningkatan konsentrasi *yeast extract* memperpanjang waktu propagasi bakteri *A. baumanni* dan memperlambat awal produksi inhibitor. Peningkatan konsentrasi pepton cenderung menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik. Aktivitas penghambatan inhibitor protease tertinggi terjadi pada media dengan kombinasi konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* masing-masing 0,5 %.

Kata kunci: *Acinetobacter*, inhibitor protease, produksi, simbiosis sponge,

PENDAHULUAN

Enzim protease berperan sebagai faktor virulensi pada proses metabolisme berbagai organisme patogen. Pada bakteri patogen, enzim ini menyebabkan berbagai penyakit, seperti: malaria, kanker, tumor, SARS, bahkan penyakit degeneratif yaitu Alzheimer (Suhartono, 2000). Suatu enzim protease dapat dihambat aktivitasnya menggunakan inhibitor protease. Melalui adanya kemampuan ini, menyebabkan inhibitor protease memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai komponen bioaktif dalam upaya mengurangi penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen.

Sponge merupakan salah satu sumber alami yang baik dalam menghasilkan komponen-komponen bioaktif termasuk inhibitor enzim (Munro *et al.,* 1999 *diacu dalam* Lee *et al.,* 2001). Beberapa tahun terakhir eksploitasi sponge gencar dilaksanakan dan para peneliti mencari sumber daya alternatif pengganti sponge yang lebih mudah untuk memproduksi senyawa bioaktif. Salah satunya adalah dengan mikroorganisme (bakteri) yang hidup bersimbiosis dengan sponge. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nurhayati dan Suhartono (2004) menunjukkan bahwa bakteri yang diisolasi dari

1 Staf Pengajar Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB
2 Staf Pengajar Depertemen Ilmu dan Teknologi Pangan, FATETA-IPB
3. Alumni Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

sponge *Plakortis nigra* memiliki aktivitas penghambatan terhadap protease bakteri *Escherichia coli.*

Salah satu faktor yang mempengaruhi produksi senyawa bioaktif oleh bakteri adalah media pertumbuhannya. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian produksi inhibitor protease oleh *A. baumanni* dengan modifikasi pertumbuhan terutama konsentrasi *peptone* dan *yeast extract*.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* yang terbaik sebagai media pertumbuhan *A. baumanni* agar dihasilkan inhibitor protease dengan aktivitas penghambatan.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Acinetobacter baumanni*, *E. coli*, *Luria Broth* (LB), *Marine Broth* (MB), D-Glukose, Bovine Serum Agar (BSA), larutan Bradford, pereaksi uji aktivitas protease dan aktivitas inhibitor protease. Sedangkan alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, pembakar spiritus, jarum ose, kapas, kertas label, pipet mikro beserta tip-nya, tabung ependorf, pH meter (*Cyberscan* 510), *sentrifuge*, inkubator, *waterbath shaker*, spektrofotometer, *magnetic stirer*, neraca analitik, autoklaf dan vorteks.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap, yaitu tahap penyegaran (*refresh*), tahap penentuan waktu propagasi, dan tahap penentuan waktu produksi inhibitor protease. Tahap penyegaran dilakukan pada agar miring untuk mempersiapkan bakteri yang akan digunakan dalam penelitian.

Tahap penentuan waktu propagasi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri *Acinetobacter baumanni* dalam *marine broth* dengan komposisi media yang sesuai dengan perlakuan pada tahap produksi inhibitor protease. Media MB sebanyak 50 ml disterilkan pada suhu 121 ºC selama 15 menit. Setelah dingin, bakteri *Acinetobacter baumanni* yang sudah disegarkan pada media miring diambil sebanyak dua ose dan dimasukkan ke dalam media MB. Kemudian media kultur diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 30 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 33 jam. Pengamatan dilakukan setiap 3 jam dengan pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm. Waktu yang ditentukan sebagai waktu propagasi diperoleh dari hasil plot nilai OD yang dihasilkan dengan waktu pengamatan. Waktu yang dipilih adalah antara pertengahan sampai akhir fase eksponensial.

Tahap penentuan waktu produksi inhibitor protease menggunakan media MB (100 ml) yang telah dimodifikasi yaitu dengan perlakuan konsentrasi *yeast extract* 0,1 % (A1), 0,5 % (A2) dan 1 % (A3) serta konsentrasi *peptone* 0,5 % (B1) dan 1 % (B2). Media tersebut ditambahkan D-Glucose sebanyak 0,05 % pada masing-masing perlakuan.

Pertama-tama bakteri yang telah disegarkan, diinokulasi ke dalam media propagasi. Setelah mencapai waktu propagasi, inokulum *Acinetobacter baumanni* diambil sebanyak 2 % kemudian dimasukkan ke dalam media produksi inhibitor protease (100 ml) (Imada 1985a). Setelah itu, media produksi diinkubasi dalam water bath *shaker* pada suhu 30 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 52 jam. Pengamatan dilakukan setiap empat jam dengan parameter yang diamati adalah OD, pH, konsentrasi protein, aktivitas protease, dan aktivitas inhibitor protease. Pengukuran aktivitas inhibitor protease dilakukan dengan metode Anson (1938) *diacu dalam* Imada (1985a) yang dimodifikasi oleh Nurhayati dan Suhartono (2004). Protease ekstrak kasar yang digunakan sebagai substrat dalam pengukuran aktivitas inhibitor protease berasal dari bakteri *E. coli* yang diproduksi dengan metode Baehaki (2004). Sedangkan untuk pengukuran kadar protein, metode yang digunakan adalah metode Bradford (1976).

Analisis Data

Data yang diperolah dari semua pengamatan dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan grafik hubungan antara waktu pengamatan dengan semua parameter yang diamati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Propagasi

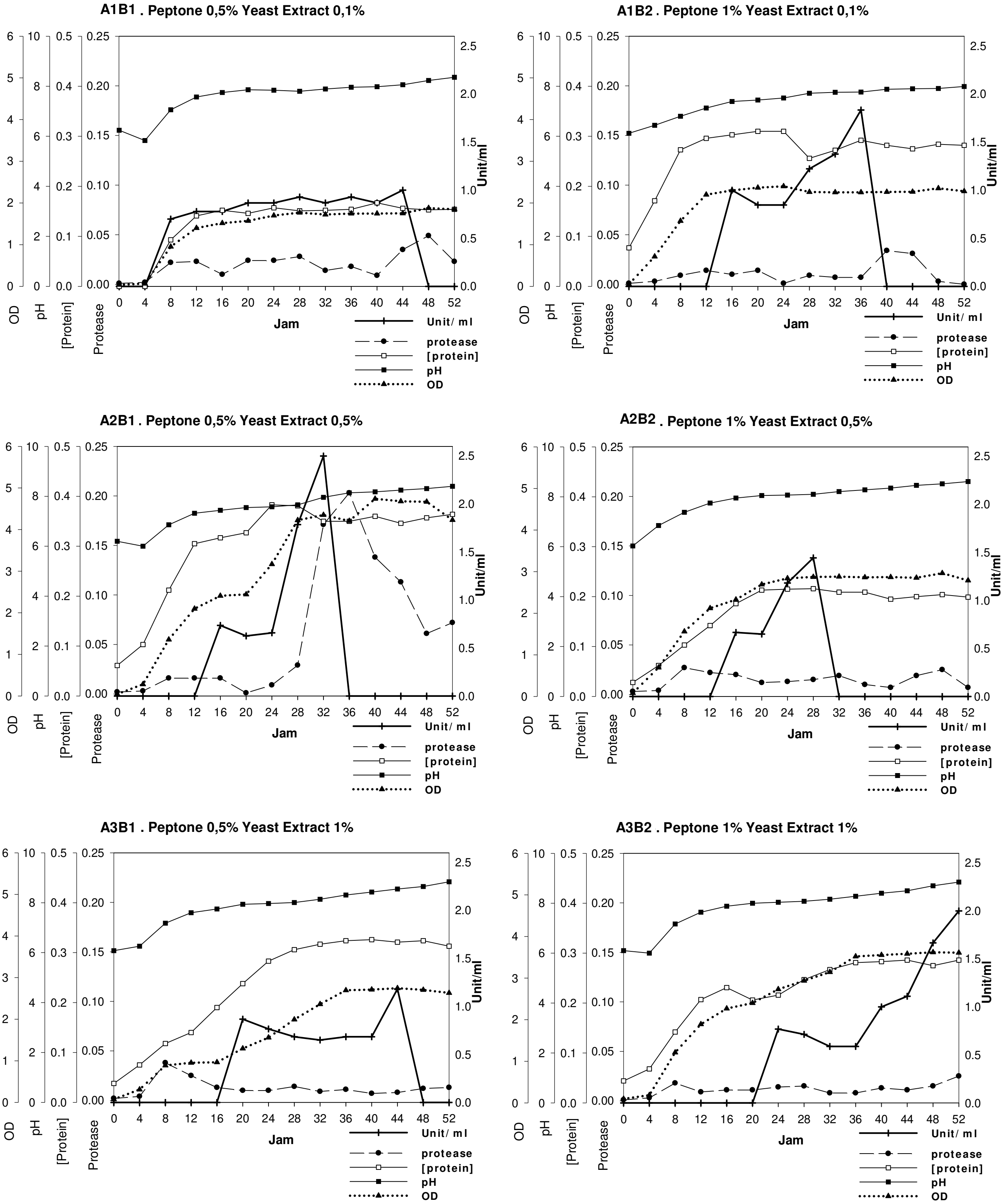
Waktu propagasi merupakan lamanya bakteri ditumbuhkan dalam media inokulum sampai bakteri siap untuk dipindahkan ke media produksi. Penelitian pada tahap penentuan waktu produksi inhibitor protease ini, menggunakan media pertumbuhan bakteri yang berbeda sehingga adaptasi bakteri terhadap media juga berbeda. Untuk mengurangi penyimpangan akibat perbedaan ini maka pada proses fermentasi didahului dengan menentukan waktu propagasi bakteri laut. Waktu propagasi perlakuan A1B1 (*yeast extract* 0,1 % dan *peptone* 0,5 %), A1B2 (*yeast extract* 0,1 % dan *peptone* 1,0 %), A2B1 (*yeast extract* 0,5 % dan *peptone* 0,5 %) dan A2B2 (*yeast extract* 0,5 % dan *peptone* 1,0 %) terjadi pada jam ke-12 dengan densitas sel masing-masing sebesar 0,8; 1,2; 1,0 dan 1,5. Sedangkan waktu propagasi perlakuan A3B1 (*yeast extract* 1,0 % dan *peptone* 0,5 %) dan A3B2 (*yeast extract* 1,0 % dan *peptone* 1,0 %) terjadi pada jam ke-18 dengan densitas sel masing-masing sebesar 2,0 dan 1,5.

Peningkatan konsentrasi *yeast extract* memperpanjang waktu propagasi yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena peningkatan konsentrasi *yeast extract* dapat memperlama kemampuan bakteri untuk melakukan aktivitas metabolik dan fisiologik dari bakteri *A. baumanni*. Pada fase pertumbuhan lambat, sel melakukan aktivitas metabolik dan fisiologik untuk mempersiapkan pembelahan. Sedangkan peningkatan konsentrasi *peptone* tidak banyak mempengaruhi lamanya waktu propagasi bakteri tetapi secara umum dapat meningkatkan jumlah densitas sel. Artinya *peptone* mendukung untuk pertumbuhan bakteri.

Produksi inhibitor protease

Hasil pengamatan terhadap parameter OD, perubahan pH, konsentrasi protein, aktivitas protease dan aktivitas inhibitor protease yang dihasilkan selama proses produksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara umum, hasil produksi inhibitor protease memperlihatkan bahwa modifikasi komposisi *marine broth* untuk produksi inhibitor protease memberikan hasil yang beragam. Peningkatan konsentrasi *peptone* dari 0,5 % menjadi 1,0 % pada setiap konsentrasi *yeast extract* yang sama cenderung menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik, yaitu densitas sel mengalami peningkatan, kecuali perlakuan A2B1 (berkisar antara 0,044–4,740) terhadap perlakuan A2B2 (berkisar antara 0,081–2,964), densitas sel mengalami penurunan (Gambar 1). Densitas sel tertinggi dihasilkan pada perlakuan A2B1 yaitu berkisar antara 0,044–4,740.



Gambar 1. Produksi inhibitor protease, OD, pH, konsentrasi protein dan aktivitas protease selama proses fermentasi untuk semua perlakuan yang dicobakan

Peningkatan konsentrasi *peptone* dari 0,5 % menjadi 1,0 % pada setiap konsentrasi *yeast extract* yang sama juga cenderung mengurangi lamanya waktu produksi inhibitor protease dari bakteri *A. baumanni*, kecuali pada perlakuan A3B1 inhibitor protease diproduksi selama 24 jam terhadap A3B2 produksi inhibotor protease diproduksi selama 28 jam (Gambar 1) Pada perlakuan A1B1 inhibitor protease diproduksi selama 36 jam, sedangkan pada perlakuan A1B2 selama 20 jam. Perlakuan A2B1 produksi inhibitor protease selama 16 jam sedangkan pada perlakuan A2B2 produksi inhibitor protease selama 12 jam. Aktivitas penghambatan tertinggi oleh inhibitor protease yang dihasilkan terjadi pada perlakuan A2B1 (Gambar 1).

Berdasarkan kedua data ini dapat disimpulkan bahwa produksi sel atau pertumbuhan menentukan tingkat aktivitas penghambatan dari inhibitor protease yang dihasilkan. Dengan kata lain semakin tinggi pertumbuhan semakin tinggi aktivitas penghambatan yang dihasilkan oleh inhibitor protease. Produksi inhibitor protease secara umum terjadi pada akhir fase eksponensial sampai fase stasioner (Gambar 1).

Hal ini diduga karena adanya batas maksimal dari bakteri *A. baumanni* untuk menggunakan *peptone* dan *yeast exstract* sebagai faktor pertumbuhan dalam metabolismenya maupun dalam memproduksi inhibitor protease. Batas maksimal tersebut yaitu pada konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* sebesar 0,5 % (perlakuan A2B1). *Peptone* merupakan bahan yang mendukung pertumbuhan karena mengandung asam amino, N, P, dan S yang digunakan untuk sintesis protein dan sintesis asam nukleat (Todar 2004). *Peptone* juga merupakan sumber nitrogen yang kaya akan vitamin dan karbohidrat (Anonymous 2005).

Sebaliknya peningkatan konsentrasi *yeast extract* dari 0,1 % menjadi 1,0 % pada setiap konsentrasi *peptone* yang sama akan memperlambat awal dimulainya produksi inhibitor protease. Hal ini terlihat dari perlakuan A1B1 (*yeast extract* 0,1 %; *peptone* 0,5 %), A2B1 (*yeast extract* 0,5 %; *peptone* 0,5 %) dan A3B1 (*yeast extract* 1,0 %; *peptone* 0,5 %) memperlihatkan dimulainya produksi inhibitor protease masing-masing terjadi pada jam ke-8, jam ke-12, dan jam ke-20. Sedangkan pada perlakuan A1B2 (*yeast extract* 0,1 %; *peptone* 1,0 %), A2B2 (*yeast extract* 0,5 %; *peptone* 1,0 %) dan A3B2 (*yeast extract* 1 %;

peptone 1 %), awal permulaan produksi inhibitor protease masing-masing terjadi pada jam ke-16, jam ke-16 dan jam ke-24.

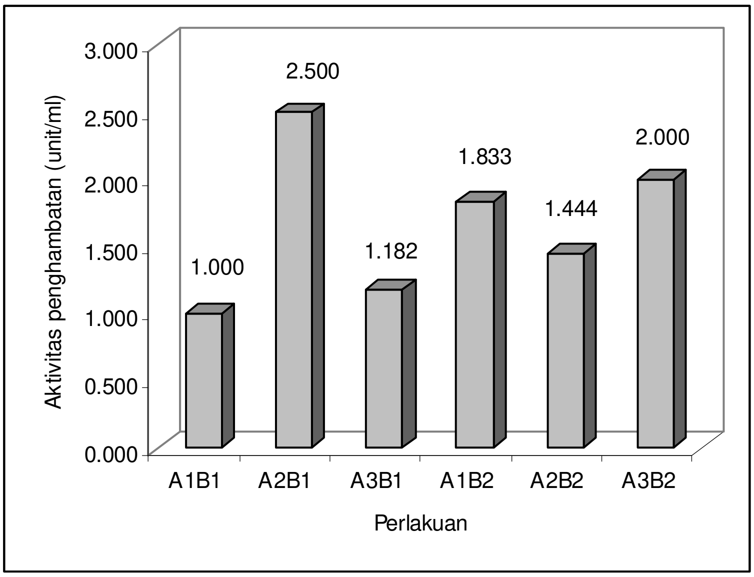
Yeast extract adalah zat yang baik untuk mendorong pertumbuhan bakteri (Anonymous 2005). Pada awal pertumbuhan, *yeast extract* cenderung mendorong bakteri untuk berkembangbiak sehingga densitas sel meningkat cepat. Setelah konsentrasi *yeast extract* berkurang, bakteri *A. baumanni* mulai memproduksi inhibitor protease yaitu pada akhir fase logaritmik dari pertumbuhan bakteri *A. baumanni*. Dengan demikian, *yeast extract* cenderung mendukung pertumbuhan bakteri tetapi kurang mendukung produksi inhibitor protease. Dengan kata lain semakin tinggi konsentrasi *yeast extract* yang ada pada media maka awal produksi inhibitor protease semakin lama. *Yeast extract* merupakan faktor pembatas dalam produksi inhibitor protease. Aktivitas penghambatan tertinggi dari inhibitor protease yang dihasilkan diperoleh pada konsentrasi *yeast extract* 0,5 % dengan konsentrasi *peptone* 0,5 % yaitu sebesar 2,500 unit/ml.

Peningkatan konsentrasi protein sejalan dengan peningkatan nilai densitas sel bakteri. Semakin tinggi nilai densitas sel yang terukur maka konsentrasi protein juga tinggi. Pada saat itu, terjadi produksi inhibitor protease sehingga senyawa inhibitor protease yang diproduksi juga merupakan protein (Gambar 1).

Selama pertumbuhan bakteri *A. baumanni* cenderung terjadi perubahan pH media yang relatif sama pada semua perlakuan yaitu berkisar antara pH 5,83–8,85. Akan tetapi dari sisi produksi inhibitornya, terlihat adanya perbedaan nilai pH pada awal produksi. Pada setiap konsentrasi *peptone* yang sama, peningkatan konsentrasi *yeast extract* akan meningkatkan pH awal terbentuknya inhibitor protease. Hal ini terlihat dari perlakuan A1B1, A2B1 dan A3B1 dengan nilai pH awal produksi inhibitor sebesar 7,06; 7,44 dan 7,94. Pada perlakuan A1B2, A2B2 dan A3B2 juga memperlihatkan hal yang sama dengan nilai pH sebesar 7,39; 7,95 dan 8,04. Hal ini terjadi karena *peptone* dan *yeast extract* mengandung nitrogen yang akan meningkatkan nilai pH ketika larut dalam air. Ketika inhibitor protease diproduksi, pH yang terukur pada media meningkat secara bertahap antara 7,0 sampai 8,5. Dengan demikian, inhibitor protease diproduksi oleh bakteri *A. baumanni* pada pH normal sampai agak basa.

Peningkatan konsentrasi *yeast extract* dan *peptone* juga mempengaruhi lamanya bakteri *A. baumanni* memproduksi inhibitor protease. Pada perlakuan A1B1, A2B1 dan A3B1 produksi inhibitor protease masing-masing berlangsung selama 36 jam, 16 jam, 24 jam, sedangkan pada perlakuan A1B2, A2B2 dan A3B2 produksi inhibitor protease masing-masing berlangsung selama 20 jam, 12 jam, dan 28 jam. Semua perlakuan menunjukkan bahwa konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* terendah (A1B1) menghasilkan waktu produksi inhibitor protease yang panjang yaitu selama 36 jam dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Konsentrasi *yeast extract* dan *peptone* yang rendah menyebabkan pertumbuhan yang lambat dimana densitas sel yang dihasilkan juga paling rendah yaitu berkisar antara 0,037–1,848. Ddemikian juga dengan aktivitas penghambatan dari inhibitor yang dihasilkan berkisar antara 0,7–1,0. Aktivitas penghambatan tertinggi dari inhibitor protease yang dihasilkan oleh *A. baumnanni* selama proses produksi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas penghambatan tertinggi oleh inhibitor protease pada semua perlakuan (*Yeast extract*: 0,1%(A1), 0,5%(A2), 1%(A3); *Peptone*: 0,5%(B1), 1%(B2))

Gambar 2 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi *yeast extract* pada konsentrasi *peptone* 0,5 % akan menyebabkan aktivitas penghambatan tertinggi meningkat kemudian menurun. Berbeda dengan konsentrasi *peptone* 1,0 %, aktivitas penghambatan tertinggi menurun kemudian meningkat. Aktivitas penghambatan tertinggi dari semua perlakuan yang dicobakan terjadi pada perlakuan A2B1 (*yeast extract* dan *peptone* masing-masing 0,5 %). Dengan kata lain aktivitas penghambatan tertinggi dari inhibitor yang dihasilkan tergantung kepada konsentrasi *yeast extract* dan *peptone* yang digunakan.

Perlakuan A2B1 merupakan batas maksimum banyaknya konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* yang digunakan untuk produksi inhibitor protease yang mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi. Peningkatan konsentrasi *peptone* dan *yeast extract* yang lebih besar akan menurunkan aktivitas penghambatan dari inhibitor protease yang dihasilkan. Sumber nutrisi dan nitrogen kompleks berupa *polypepton* adalah sumber yang paling cocok untuk pertumbuhan bakteri dan juga produksi inhibitor protease dengan konsentrasi optimal sebesar 0,6 % (Imada 1985a).

KESIMPULAN DAN SARAN

Peningkatan konsentrasi *yeast extract* dapat memperlama waktu propagasi dari bakteri *A baumanni*. Sedangkan peningkatan konsentrasi *peptone* tidak banyak mempengaruhi pertumbuhan bakteri *A baumanni*dalam penentuan waktu propagasi.

Peningkatan konsentrasi *peptone* dari 0,5 % menjadi 1,0 % pada setiap konsentrasi *yeast extract* yang sama cenderung menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik. Densitas sel tertinggi dihasilkan pada perlakuan A2B1 yaitu berkisar antara 0,044–4,740. Sebaliknya peningkatan konsentrasi *yeast extract* dari 0,1 % menjadi 1,0 % pada setiap konsentrasi *peptone* yang sama akan memperlambat awal dimulainya produksi inhibitor protease. Peningkatan konsentrasi *yeast extract* dan *peptone* juga mempengaruhi lamanya bakteri *A.baumanni* memproduksi inhibitor protease.

Selama pertumbuhan bakteri *A. baumanni* cenderung terjadi perubahan pH media yang relatif sama untuk semua perlakuan yaitu berkisar antara pH 5,83–8,85. Ketika inhibitor protease diproduksi, pH yang terukur pada media meningkat secara bertahap antara 7,0 sampai 8,5. Dengan demikian, inhibitor protease diproduksi oleh bakteri *A. baumanni* pada pH normal sampai agak basa.

Konsentrasi *peptone* sebesar 0,5 % dan *yeast extract* sebesar 0,5 % merupakan kombinasi media terbaik untuk menghasilkan aktivitas penghambatan tertinggi dari inhibitor proteses yang dihasilkan oleh *A. baumanni*.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati daya hambat bakteri *A. baumanni* terhadap protease bakteri patogen lainnya. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian tentang pemurnian dan karakterisasi inhibitor protease yang dihasilkan oleh bakteri *A. baumanni*.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2005. Media ingredients, peptones and hydrolysates. www.neogen.com/ pdf/Acumedia/MediaIngredients.pdf [January 29, 2005].

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantitites of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Baehaki A. 2004. Karakterisasi protease beberapa bakteri patogen. Tesis. Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Imada C, Taga N, Maeda M. 1985a. Cultivation conditions for subtilisin inhibitor-producing bacterium and general properties of the inhibitor “marinostatin”. Bull. of *Jap. Soc. of Sci. Fish.* 51(5): 805-810.

Lee YK, LeeJH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *The Journal of Microbiology*. 39: p.254 -264.

Munro MH *et al.* 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* 70: 15-25.

Nurhayati T, Suhartono MT. 2004. Pemilahan dan Karakterisasi Inhibitor Protease dari Mikroba Laut pada Bunga Karang (Sponge) Kepulauan Seribu. Bogor : LPPM, IPB.

Suhartono MT. 2000. Pemahaman karakterisasi biokimia enzim protease dalam mendukung industri berbasis bioteknologi [Orasi Ilmiah]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor.

Todar K. 2004. Nutrition and growth of bacteria. http://textbookofbacteriology.net/ nutgro.html [13 April 2005].