PENGARUH VARIASI pH DAN NaCl TERHADAP PRODUKSI INHIBITOR PROTEASE YANG DIHASILKAN OLEH *Acinetobacter baumanii* (BAKTERI YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS *Plakortis nigra)*

Tati Nurhayati[1], Maggy T. Suhartono[2], Desniar[1], Rini Suwardinni[3]

Abstrak

Mengingat semakin jelasnya keterlibatan protease dalam penyebab penyakit, maka diperlukan suatu senyawa untuk menghambat aktivitas enzim tersebut, yaitu inhibitor protease. Senyawa tersebut dapat dihasilkan oleh makro dan mikroorganisme laut. Untuk memproduksi inhibitor protease diperlukan suatu kondisi produksi yang tepat, termasuk NaCl dan pH media. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah menentukan konsentrasi NaCl dan pH yang tepat dalam media untuk menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi. Metode yang digunakan untuk mencapai tujuan tersebut adalah dengan menumbuhkan *Acinetobacter baumanii* dalam media *marine broth*+glukosa 0,05 %(w/v) dengan melakukan variasi NaCl (0 %,2 %, dan 4 %(w/v)) dan juga pH (6,7, dan 8). Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa konsentrasi NaCl yang tepat untuk produksi maksimum adalah 2 %(w/v) dan pH media 8 dengan waktu inkubasi 20-28 jam. Aktivitas tertinggi yang dihasilkan adalah 1,64-1,93 U/ml.

Kata kunci: *Acinetobacter baumanii,* inhibitor protease

PENDAHULUAN

Bakteri patogen dalam menjalankan aksinya menggunakan beberapa cara, yang dikenal dengan istilah faktor virulensi, diantaranya dengan mensekresikan protease ke dalam inangnya. Mengingat pentingnya protease dalam mekanisme terjadinya penyakit, maka dalam dasarwarsa terakhir ini perhatian terhadap protease sebagai target senyawa obat bagi penyakit asal bakteri, virus, bahkan penyakit degeneratif meningkat pesat (Suhartono, 2000). Saat ini obat-obatan yang beberapa diantaranya mempunyai mekanisme inhibitor protease telah tersedia di pasaran, seperti elafin, antileukoprotease, inhibitor serum ayam, serta inhibitor protease alkalin dari *Streptomyces* sp.

Beraneka ragam makhluk hidup dapat menjadi sumber inhibitor protease, termasuk dari makro dan mikroorganisme yang hidup di laut. Spons merupakan salah satu makroorganisme laut yang potensial sebagai penghasil komponen bioaktif, termasuk inhibitor enzim seperti *Irchinia* sp. sebagai penghasil inhibitor HIV reverse transkriptase (Loya *et al.,* 1997), *Xetospongia exigua* sebagai penghasil inhibitor tirosin kinase, juga *Theonella* sp. sebagai penghasil inhibitor

[1] Staf Pengajar pada Departemen Teknologi Hasil Perairan, FPIK, IPB
[2] Guru Besar pada Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fateta, IPB
[3] Alumni Departemen Teknologi Hasil Perikanan, FPIK, IPB

protease serin (Nakao *et al.,* 1998 diacu dalam Mayer dan Lehmann 2000). Begitu pula dengan mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons. Hal ini disebabkan karena terdapat hubungan simbiotik antara spons dan mikroorganisme, mengingat spons merupakan hewan yang memakan makanan dengan cara menyaring makanan (*filter feeder*) (Lee *et al.,* 2001). Flowers *et al.* (1998) melaporkan bahwa simbion spons *Oscillatoria spongeliae* mengandung senyawa diketopiperazin yang juga dihasilkan oleh inangnya, yaitu *Dysidea herbacea.* Hasil penelitian yang diperoleh Nurhayati dan Suhartono (2004) menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons *Plakortis nigra* yaitu *Acinetobacter baumanii* menghasilkan inhibitor protease *Escherichia coli.* Spons tersebut juga menghasilkan inhibitor protease yang sama (Nurhayati *et al.,* 2004). Selanjutnya Nurhayati *et al.* (2006) melaporkan bahwa spons *Jaspis stellifera* dan juga simbionnya menghasilkan inhibitor protease *Staphylococcus aureus.*

Imada *et al.* (1985) melaporkan bahwa produksi inhibitor protease dari *Alteromonas* sp. ditentukan oleh kondisi medianya, termasuk konsentrasi NaCl dan pH medium. Inhibitor protease tersebut dihasilkan paling baik pada konsentrasi NaCl 3,5 %(w/v) dengan pH medium 6. Konsentrasi polipepton terbaik untuk produksi inhibitor protease tersebut adalah 0,6 %(w/v). Desniar *et al.* (2006) melaporkan bahwa konsentrasi pepton dan yeast ekstrak berpengaruh terhadap produksi inhibitor protease *E. coli* yang dihasilkan oleh *A. baumanii.* Kombinasi pepton dan yeast ekstrak masing-masing sebesar 0,5 %(w/v) menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi.

Setelah diketahui kombinasi pepton dan yeast ekstrak terbaik untuk produksi inhibitor protease, maka kondisi media produksi, seperti pH dan konsentrasi NaCl merupakan parameter penting untuk diteliti. Dengan demikian diharapkan akan didapatkan media dan kondisi produksi yang tepat untuk produksi inhibitor protease *E. coli.* Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah mendapatkan kondisi pH dan konsentrasi NaCl terbaik guna meningkatkan produksi inhibitor protease dari *A. baumanii.*

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *E. coli* sebagai sumber protease yang diperoleh dari Rumah Sakit Pusat Pertamina Jakarta dan *A. baumanii* yang diperoleh dari koleksi pribadi. Bahan-bahan untuk media produksi meliputi media untuk produksi protease, yaitu Luria Bertani (tripton (oxoid), yeast ekstrak (oxoid), NaCl (merck)) dan media produksi inhibitor protease, yaitu *marine broth* (pepton spesial (oxoid), yeast ekstrak, NaCl, *trace element,* glukosa (merck)). Alat-alat yang digunakan meliputi *waterbath shaker*, spektrofotometer (Pharmacia LKB, Novasvec 2), otoklaf (Tommy), mikropipet, inkubator, oven, sentrifugasi (Tommy).

Metode Penelitian

Penentuan waktu propagasi *A.baumanii*

Isolat bakteri laut ditumbuhkan pada media *marine broth* (MB) steril 150 ml dengan konsentrasi NaCl yang berbeda yaitu 0 %, 2 % dan 4 %(w/v), kemudian diinkubasi dalam *waterbath shaker* pada suhu 30 ^{o}C, kecepatan agitasi 150 rpm. Setiap 4 jam sekali dilakukan pengukuran *optical density* (OD) sampai fase kematian menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Selanjutnya dilakukan penentuan waktu propagasi bakteri laut dengan pH media 6, 7, dan 8 dengan komposisi NaCl yang terbaik. Nilai OD pada panjang gelombang 660 nm tersebut diplotkan terhadap waktu untuk mengetahui waktu propagasi, yaitu perkembangbiakan bakteri yang tepat untuk dipindahkan pada media produksi.

Produksi inhibitor protease dari *A. baumanii*

Produksi inhibitor protease diawali dengan menumbuhkan bakteri pada media MB hingga mencapai waktu propagasi. Sebanyak 2 %(v/v) inokulum dipindahkan ke dalam media produksi MB yang ditambah glukosa 0,05 %(w/v) dan diinkubasi pada suhu 30 ^{o}C dengan kecepatan agitasi 120 rpm selama 52 jam dengan waktu pengamatan setiap 4 jam. Parameter yang diamati meliputi pH (Apriyantono *et al.,* 1992), OD, aktivitas inhibitor protease (Anson 1938 yang diacu dalam Imada *et al.*, 1985 yang dimodifikasi Nurhayati dan Suhartono, 2004), konsentrasi protein (metode Bradford) (Hammond dan Kruger, 1988) dan aktivitas protease (Bergmeyer *et al.,* 1984). Sebagai substrat untuk menentukan aktivitas inhibitor protease digunakan protease dari *E. coli* yang diproduksi menurut Baehaki (2004).

Pengukuran aktivitas inhibitor protease dari *A. baumannii.*

Prosedur pengukuran aktivitas inhibitor protease adalah sebagai berikut (Anson 1938 diacu dalam Imada *et al.,* 1985 yang dimodifikasi Nurhayati dan Suhartono, 2004): campuran yang terdiri atas 0,5 ml protease dari *E. coli* dan 0,5 ml larutan inhibitor dari *A. baumanii* dipre-inkubasi pada 30^{o}C selama 12 menit. Sebanyak 1 ml kasein *hammerstein* 2 %(w/v) dalam bufer TrisCl 50 mM, pH 8 ditambahkan kedalamnya dan diinkubasi 12 menit pada suhu 30 ^{o}C. Setelah diinkubasi, 2 ml asam trikloroasetat (TCA) 5 % (w/v) ditambahkan untuk menghentikan reaksi enzim. Campuran diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu 30 ^{o}C. Setelah selesai inkubasi, larutan disaring dengan kertas saring. Filtrat yang dihasilkan ditambahkan larutan Bradford. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm.

Persentase nilai penghambatan protease dihitung menggunakan rumus:

$$\%\ \text{penghambatan} = 1 - \frac{(I_s - I_b)}{(E_s - E_b)} \times 100\ \%$$

Keterangan: I_s = absorbansi inhibitor sampel I_b = absorbansi inhibitor blanko
E_s = absorbansi enzim sampel E_b= absorbansi enzim blanko

Satu unit aktivitas inhibitor protease adalah banyaknya inhibitor protease yang diperlukan untuk menghambat aktivitas enzim protease sebesar 50 %.

Perlakuan

Produksi inhibitor protease dari *A. baumanii* menggunakan media MB dengan perlakuan konsentrasi NaCl 0 %, 2 % dan 4 %(w/v) sehingga didapatkan konsentrasi NaCl terbaik berdasarkan nilai penghambatan tertinggi dari hasil pengukuran aktivitas inhibitor protease. Selanjutnya dilakukan produksi inhibitor protease dengan perlakuan pH 6, 7 dan 8 pada konsentrasi NaCl terbaik.

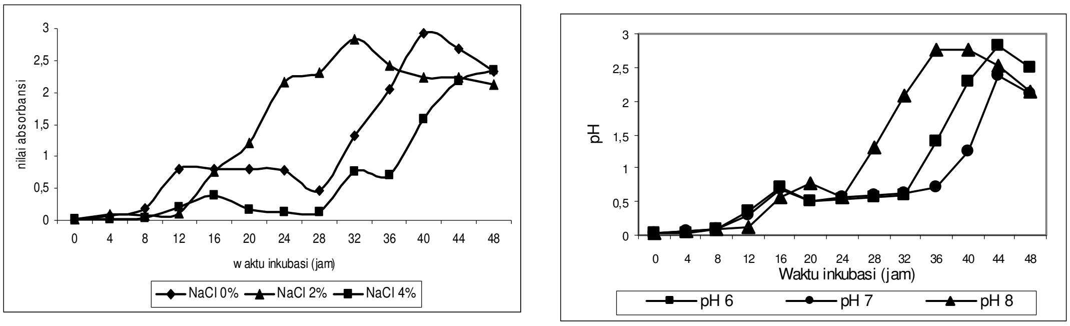
Analisis Data

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Waktu Propagasi *A. baumanii*

Waktu propagasi merupakan waktu perkembangbiakan bakteri yang tepat untuk dipindahkan ke media produksi. Waktu propagasi biasa terjadi pada fase logaritmik yang ditandai oleh pertumbuhan bakteri yang seimbang, yaitu sel membelah dengan laju konstan. Waktu propagasi dilakukan untuk mempersingkat fase adaptasi pada waktu fermentasi (Mangunwidjaja, 1994). Penentuan waktu propagasi dengan perlakuan NaCl dan pH dapat dilihat pada Gambar 1.



(A) (B)

Gambar 1. Penentuan waktu propagasi *A. baumanii* dengan perlakuan (A) NaCl 0 %, 2 % dan 4 %(w/v) dan (B) pH 6,7,8

Gambar 1(A) memperlihatkan pengaruh konsentrasi NaCl pada medium terhadap waktu propagasi *A. baumanii*. Berdasarkan Gambar 1(A) dapat ditentukan waktu propagasi pada medium yang mengandung NaCl 0 %, 2 %, dan 4 %(w/v) berturut-turut adalah 36 jam (OD=2,053), 24 jam (OD=2,169), dan 40 jam (OD=2,009).

Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi NaCl menentukan kecepatan pembelahan sel bakteri. Konsentrasi NaCl 2 %(w/v) menunjukkan jumlah yang tepat untuk mempercepat pembelahan sel bakteri yang ditandai oleh waktu propagasi yang lebih singkat dan nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi NaCl 0 % dan 4 %(w/v). Waktu propagasi yang cepat dipengaruhi oleh lingkungan dan keadaan inokulum (Fardiaz 1992). *Acinetobacter baumanii* merupakan bakteri laut yang berasosiasi dengan spons *P. nigra*, dengan konsentrasi NaCl air laut (habitat asli) bakteri tersebut sebesar 2 %(w/v)

(Nurhayati dan Suhartono, 2004). Imada *et al.* (1985) melaporkan bahwa *Alteromonas* sp. yang diisolasi dari sedimen laut mempunyai pertumbuhan paling cepat pada konsentrasi NaCl 3,5 %(w/v) sesuai dengan habitat aslinya.

Gambar 1(B) menunjukkan pengaruh pH medium terhadap waktu propagasi *A. baumanii.* Berdasarkan Gambar 1(B) dapat ditentukan waktu propagasi untuk *A. baumanii* dengan pH medium 6 adalah 40 jam dengan nilai OD 2,290. Waktu propagasi yang sama dicapai ketika bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium dengan pH 7, namun mempunyai nilai OD yang lebih rendah, yaitu 1,250. Ketika pH medium dinaikkan menjadi 8, waktu propagasi yang dicapai lebih singkat, yaitu 32 jam dengan nilai OD 2,094.

Hasil ini menunjukkan bahwa pH juga merupakan faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri. Sebagaimana yang dinyatakan oleh Fardiaz (1992) bahwa faktor lingkungan sangat mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri. Jika dibandingkan dengan pH air laut asal bakteri *A. baumnaii*, yaitu 7,6, maka dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut tumbuh baik pada pH yang sama dengan pH air laut habitat asli bakteri tersebut. *Acinetobacter baumanii* dapat tumbuh baik pada pH 7-8 (Bouvet dan Grimont, 1986).

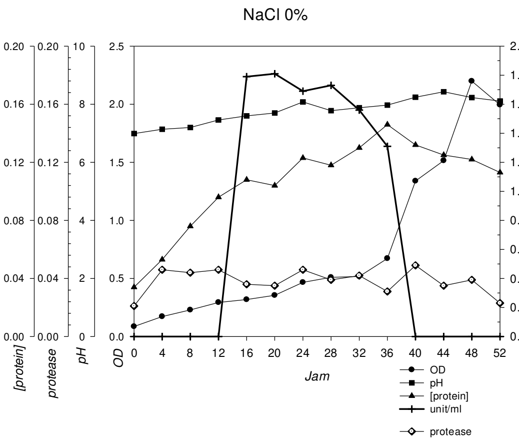
Merujuk kepada dua parameter di atas, disimpulkan bahwa pH dan NaCl mempengaruhi waktu propagasi. Waktu propagasi terpendek dicapai ketika *A. baumanii* ditumbuhkan pada konsentrasi NaCl 2 %(w/v) dan pH 8, yang merupakan kondisi yang sama dengan habitat asli bakteri tersebut.

Produksi Inhibitor Protease dari *A. baumanii*

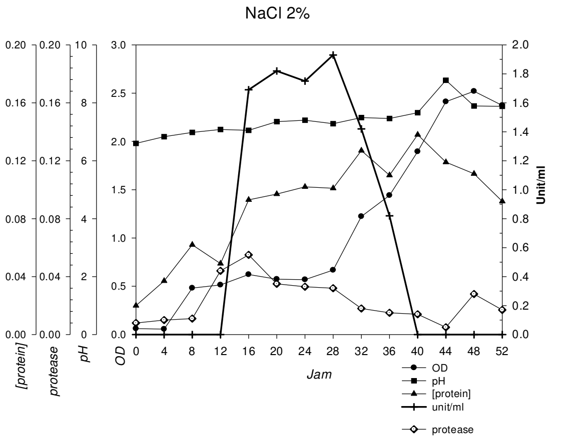
Inhibitor protease merupakan senyawa yang diproduksi dengan baik pada media fermentasi dalam kondisi yang ekstrim, yaitu pada saat semua nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi tersebut sudah berkurang. Nilai pH, OD, kadar protein, aktivitas inhibitor protease, dan aktivitas protease dari *A. baumanii* yang ditumbuhkan pada media MB+glukosa 0,05 %(w/v) dengan variasi NaCl 0 %, 2 %, dan 4 %(w/v) selama inkubasi disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2(A) memperlihatkan bahwa *A. baumanii* yang ditumbuhkan dalam media MB+glukosa 0,05 %(w/v) dengan konsentrasi NaCl 0 %(w/v), memproduksi inhibitor protease setelah inkubasi selama 16 jam sampai 36 jam. Nilai penghambatan tertinggi terjadi setelah bakteri tersebut diinkubasi selama

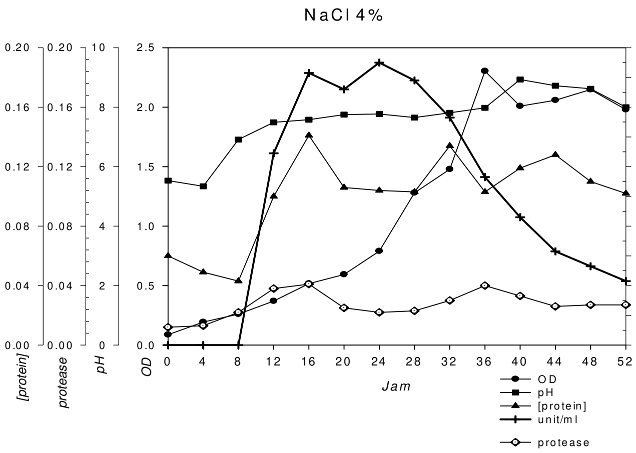
20 jam dengan nilai aktivitas sebesar 1,81 unit/ml dan konsentrasi protein 0,118 mg/ml. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik.



(A)



(B)



(C)

Gambar 2. Produksi inhibitor protease, OD, pH, protein dan protease dalam media yang mengandung NaCl 0 % (A), NaCl 2 % (B) dan NaCl 4 %(w/v) (C) dari bakteri *A. baumannii*

Gambar 2(B) memperlihatkan bahwa *A. baumanii* yang ditumbuhkan dalam media MB+glukosa 0,05 %(w/v) dengan konsentrasi NaCl 2 %(w/v), memproduksi inhibitor protease setelah inkubasi selama 16 jam sampai 36 jam. Nilai penghambatan tertinggi terjadi setelah bakteri tersebut diinkubasi selama 28 jam dengan nilai aktivitas sebesar 1,93 unit/ml dan konsentrasi protein 0,101 mg/ml. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik.

Gambar 2(C) memperlihatkan bahwa *A. baumanii* yang ditumbuhkan dalam media MB+glukosa 0,05 %(w/v) dengan konsentrasi NaCl 4 %(w/v), memproduksi inhibitor protease setelah inkubasi selama 12 jam sampai 52 jam. Nilai penghambatan tertinggi terjadi setelah bakteri tersebut diinkubasi selama 24 jam dengan nilai aktivitas sebesar 1,90 unit/ml dan konsentrasi protein 0,104 mg/ml. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik sampai fase stasioner.

Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan konsentrasi protein pada media tumbuh *A. baumanii* yang mengandung NaCl (0 %, 2 % dan 4 % w/v) seiring dengan peningkatan OD. Dalam hal ini, diduga bahwa inhibitor protease merupakan protein.

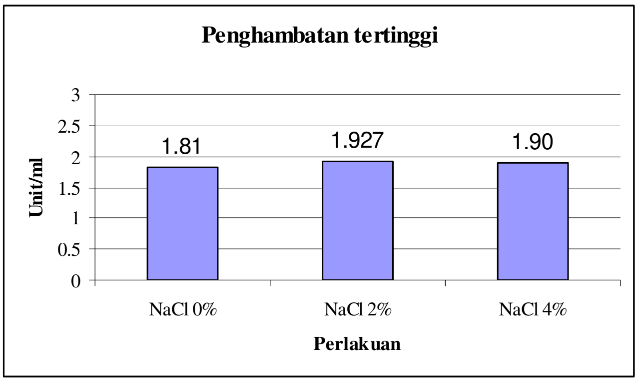
Bila ditinjau dari parameter peningkatan nilai OD, maka berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa OD tertinggi pada *A. baumanii* yang ditumbuhkan dalam media baik yang mengandung NaCl 0 %, 2 %, maupun 4 %(w/v) terjadi setelah bakteri tersebut diinkubasi 48 jam . Namun terdapat perbedaan nilai OD, dengan nilai tertinggi dicapai ketika bakteri tersebut ditumbuhkan dalam media yang mengandung NaCl 2 %(w/v) yaitu sebesar 2,52 (Gambar 2(B)). Ini berarti bahwa kondisi NaCl terbaik untuk pertumbuhannya adalah yang sesuai dengan kondisi NaCl habitat asli bakteri tersebut.

Konsentrasi NaCl yang berbeda (0 %, 2 % dan 4 %w/v) pada médium produksi ternyata berpengaruh terhadap titik awal diproduksinya inhibitor protease seperti dapat dilihat pada Gambar 2. Titik awal diproduksi inhibitor protease pada médium yang mengandung NaCl 0 % dan 2 %(w/v) sama, yaitu setelah *A. baumanii* diinkubasi selama 16 jam (Gambar 2(A) dan 2(B)). Ketika NaCl dalam médium ditingkatkan menjadi 4 %(w/v) inhibitor protease dihasilkan dengan titik awal produksi yang lebih singkat yaitu setelah inkubasi 8 jam (Gambar 2(C)). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa bakteri *A. baumannii* membutuhkan NaCl yang tepat dalam produksi inhibitor protease. Imada *et al.* (1985) menyatakan bahwa inhibitor protease dari bakteri laut *Alteromonas* sp. dihasilkan dengan aktivitas yang tinggi pada konsentrasi NaCl 3,5 %(w/v).

Secara umum, peningkatan konsentrasi NaCl 0 % sampai 4 %(w/v) dalam medium produksi *A. baumanii* tidak menyebabkan perubahan pH yang berarti selama inkubasi, yaitu sekitar 7-8,5. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa inhibitor protease yang diproduksi pada *A. baumannii* terjadi pada pH netral. Imada *et al*. (1985) menyatakan bahwa inhibitor protease yang berasal dari *Alteromonas* sp. yang disebut marinosatin diproduksi pada pH 6-7.

Selama produksi inhibitor protease (Gambar 2A-2C), ternyata *A. baumanii* juga menghasilkan protease, namun aktivitasnya sangat rendah dan cenderung konstan, yaitu berkisar 0,01-0,04 U/ml.

Berdasarkan pengukuran aktivitas inhibitor protease yang dihasilkan *A. baumanii* terhadap protease *E. coli* dalam media dengan konsentrasi NaCl 0 %, 2 % dan 4 %(w/v) dipilih nilai penghambatan tertinggi untuk masing-masing perlakuan yaitu sebesar 1,81 unit/ml, 1,93 unit/ml dan 1,90 unit/ml (Gambar 3). Setelah diketahui nilai penghambatan tertinggi dari ketiga perlakuan tersebut dipilih nilai penghambatan terbaik yaitu NaCl 2 % (w/v) dengan nilai penghambatannya sebesar 1,93 unit/ml.



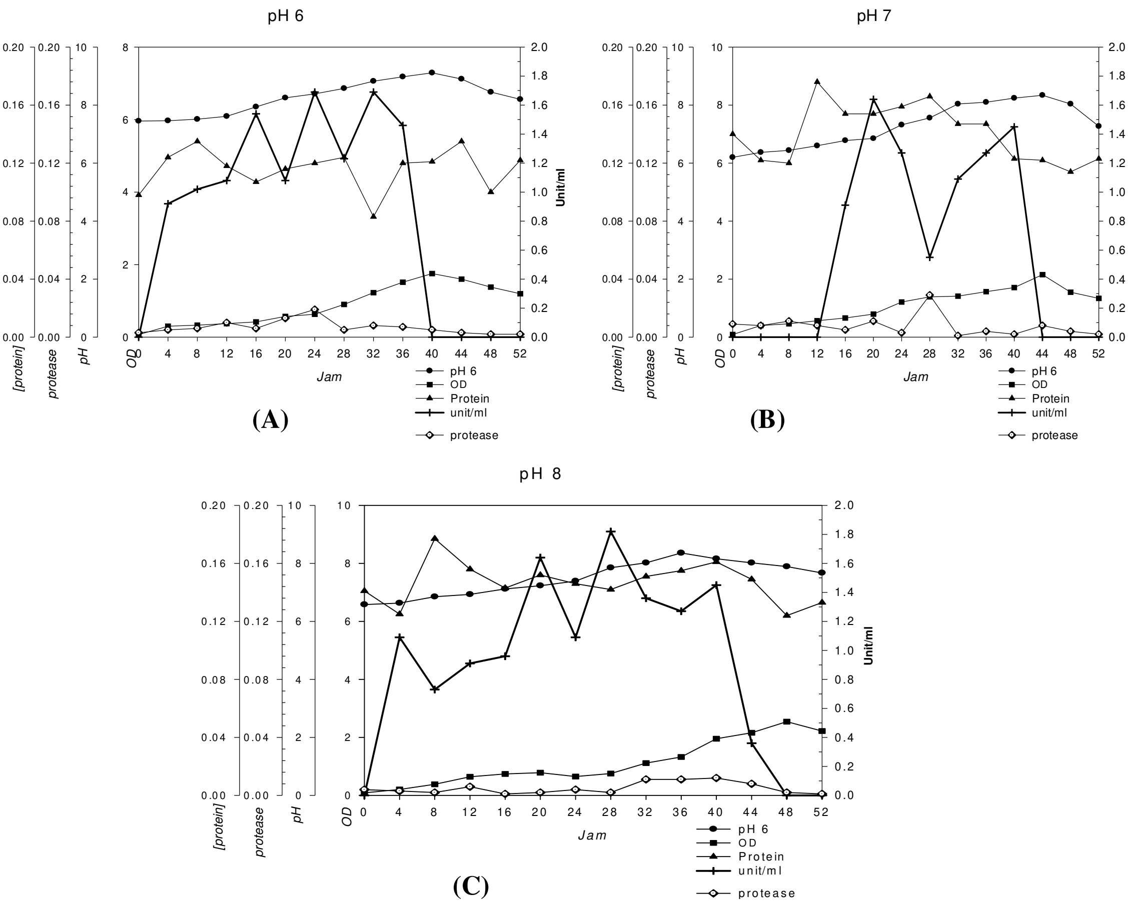
Gambar 3. Aktivitas inhibitor protease tertinggi yang dihasilkan oleh *A. baumanii* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung NaCl 0 %, 2 %, dan 4 %(w/v)

Nilai pH, OD, protein, aktivitas inhibitor protease, dan aktivitas protease dari *A. baumanii* yang ditumbuhkan pada media MB+glukosa 0,05 %(w/v) dengan variasi pH 6,7, dan 8 selama inkubasi disajikan pada Gambar 4.

Gambar 4(A) memperlihatkan bahwa *A. baumanii* yang ditumbuhkan pada media dengan pH 6 memproduksi inhibitor protease setelah diinkubasi 4 jam sampai 36 jam. Inhibitor protease dengan aktivitas penghambatan tertinggi terjadi setelah bakteri tersebut diinkubasi selama jam ke-16 dengan nilai aktivitas sebesar

1,54 unit/ml, konsentrasi protein 0,107 mg/ml. Inhibitor protease dihasilkan pada fase logaritmik.

Acinetobacter baumanii yang ditumbuhkan pada media produksi dengan pH 7, menghasilkan inhibitor protease selama inkubasi 16 sampai 40 jam (Gambar 4(B)). Inhibitor protease dengan nilai penghambatan tertinggi terjadi setelah diinkubasi 20 jam dengan aktivitas sebesar 1,64 unit/ml, konsentrasi protein 0,154 mg/ml dan jam ke-40 dengan aktivitas sebesar 1,45 unit/ml, konsentrasi protein 0,161 mg/ml. Adanya dua puncak aktivitas ini diperkirakan karena adanya kerja metabolit yang berbeda. Pada aktivitas metabolit yang pertama meningkatnya penghambatan seiring dengan peningkatan kadar protein, sedangkan metabolit yang kedua aktivitasnya berkorelasi dengan penurunan kadar protein (Sabana, 2004). Inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik.



Gambar 4. Produksi inhibitor protease, OD, pH, protein dan protease dalam media dengan pH 6 (A), pH 7 (B) dan pH 8 (C) dari bakteri *A. baumannii*.