Pemurnian Ekstraseluler Hyaluronidase *Streptococcus agalactiae* (Streptokokus Grup B)

Wendry Setiyadi Putranto[1), Sri Budiarti[2), Maggy T Suhartono[3), I Wayan T Wibawan[4), Zainatul Hayati[5)

[1)Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran
[1)Jurusan Biologi Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor
[2)Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor
[3)Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
[5)Fakultas Kedokteran Universitas Syah Kuala

Abstrak

Hyaluronidase (EC 4.2.2.1) merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan *Streptococcus agalactiae (Streptokokus Grup B).* Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas spesifik dari hyaluronidase *S. agalactiae* dan berat molekul proteinnya. Pemurnian enzim dengan sentrifugasi, pengendapan amonium sulfat 45% dan kromatographi kolom dengan Sephadex G-100 dan *Sodiumdodecyl sulfate polyacrylainide gel electrophoresis* (SDS PAGE). Enzim hyaluronidase dari *S. Agalactiae* memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,0012 U/mg (ekstrak kasar), 0,0125 U/mg (pengendapan dengan 45% ammonium sulfate) and 0,032 U/mg (Gel Filtration). Berat molekul protein hyaluronidase adalah 102 - 106 kD.

Kata kunci : hyaluronidase, aktivitas spesifik, pemurnian

Abstract

Hyaluronidase (EC 4.2.21) was extracelluler enzyme from *Streptococcus agalactiae (Grup B Streptococcus).* The aim of research was to find out specific activity of hyaluronidase and molecular weight of the enzyme. This enzyme was purified using centrifugation, 45% ammonium sulfate precipitation, column chromatography using Sephadex G-100 and *Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE). The hyaluronidase from *S. agalactiae* had specific activity of 0,0012 U/mg (crude extract), 0,0125 U/mg (purified using 45% ammonium sulfate precipitation) and 0,032 U/mg (Gel Filtration). The molecular weight of hyaluronidase was about 102-106 kD.

Keywords: hyaluronidase, specific activity, purification

Pendahuluan

Hyaluronidase (EC 4.2.2.1) merupakan enzim ekstraselluler yang menghidrolisa asam hyaluronat, yaitu semen jaringan yang merekatkan sel-sel hidup menjadi satu. Hyaluronidase dihasilkan oleh kebanyakan streptokokus,dan merupakan faktor virulensi bakteri tersebut untuk melakukan invasi. Streptokokus Grup B (SGB) atau *Streptococcus agalactie* merupakan agen penyakit yang menyebabkan mastitis sapi atau infeksi neonatal pada manusia seperti septicemia dan meningitis (Baker,1980). Bakteri tersebut dapat pula menginfeksi anjing, kelinci dan merpati (Butter,dkk.1967). Pada manusia *Streptococcus agalactie* dapat menyebabkan kematian pada bayi (neonatal septicemi) , peradangan selaput otak (meningitis), endocarditis (radang jantung), peritonitis, pleuritis, dan arthritis (Wilkinson, 1978).

Hyaluronidase dihasilkan oleh berbagai organisme, antara lain: hyaluronidase yang diisolasi dari bisa ular, seperti yang dilaporkan oleh Kudo,dkk. (2001), menyatakan bahwa hyaluronidase dari *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern lopperhead) memiliki berat molekul berdasarkan *Assited laser desorption ionization mass spectroscopy* diperoleh sebesar 59.290 Da, sedangkan menggunakan SDS-PAGE berat molekul sebesar 61.000 Da. Spesifik pada subtrat asam hyaluronat dan tidak menghidrolisa polisakarida lain seperti chondroitin 4 - sulfate, chondroitin - 6- sulfate, dernatan sulfate, keratan sulfate, dan heparin. Enzim tersebut merupakan endo - glycosidase tanpa aktivitas exo - glycosidase, sehingga tidak dapat menghidrolisa p - nitrophenyl - D - glucuronide atau p - nitrophenyl - N - acetyl - β - D - glucosaminide. Produk utama dari hidrolisa asam hyaluronat adalah hexa dan tetrasacharida N - acetylglucosamine dengan titik potong pada rantai β 1,4 - gycosidic, dan bukan pada rantai β 1,3 - glycosidic, jadi hyaluronidase dari bisa ular merupakan endo β - N - acetylhexasaminidase dan spesifik untuk asam hyaluronat. Enzim tersebut memiliki pH optimum 6, suhu optimum 37°C, dan kehilangan aktivitas pada suhu 60°C. Konsentrasi NaCl 0,2 M dalam larutan memberikan aktivitas tertinggi.

Hyaluronidase dari serum manusia dilaporkan oleh Afify,dkk.(1993) menyatakan bahwa enzim tersebut memiliki pH optimum 3,7. Toida,dkk. (1999) melaporkan bahwa dengan menggunakan metoda baru FIA *(Flow Injection Assay)* dapat diukur aktivitas hyaluronidase dan pengaruh inhibitor dari O- sulfonated glycosaminoglycans terhadap enzim tersebut. Produk hasil dapat dideteksi oleh FIA dengan fluorometric detection menggunakan fluorogenic reagent 2-cyanoacetamide. Hyaluronidase dari urine manusia memiliki aktivitas 46 - 59 TRU/mg *(Turbidity Reducing* Unit/ mg protein). Satu TRU didefinisikan sebagai jumlah enzim hyaluronidase yang menyebabkan penurunan turbidity - producing capacity dari 0,2 mg - 0,1 mg asam hyaluronat dalam 30 menit pada suhu 37 °C. Diantara glycosaminoglycan hanya O- sulfanated dari heparin yang menghambat hyaluronidase secara non kompetitif, sedangkan O- sulfanated dari asam hyaluronat menghambat hyaluronidase secara kuat baik kompetitif maupun nonkompetitif.

Sedangkan hyaluronidase yang berasal dari bakteri, enzim tersebut merupakan enzim ekstrasellular yang dihasilkan oleh kebanyakan streptokokus. Enzim tersebut merupakan faktor vinilensi untuk merusak asam hyaluronat jaringan konektif untuk memudahkan penvebaran bakteri tersebut, sehingga enzim tersebut disebut juga sebagai *spreading factor* Hyaluronidase dari bakteri dikenal juga dengan nama hyaluronat lyase.

Hynes,dkk.(2000) menyatakan bahwa gen hyaluronidase *(hyl A)* dari Streptococcus Group A (SGA) atau *Streptococcus pyogenes* terdiri dari 868 asam amino dan ukuran protein enzimnya sebesar 99.636 Da. Terdapat homologi yang cukup tinggi pada tingkat gen penyandi hyaluronidase antara *Streptococcus pneumoniae, Streptococcus agalactiae,* dan *Staphylococcus aureus.* Sedangkan Pritchard dkk. (1994) melaporkan bahwa dengan SDS PAGE menunjukkan satu band hyaluronidase dengan berat molekul 100 kD.

Hyaluronate lyase dari *Staphylococcus aureus* memiliki pH optimum 7,8 dalam bufer yang mengandung NaCI. Satu aktivitas hyaluronidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalis pelepasan 1 nmol disakarida 2- acetamido - 2 - deoxy - 3-(β - D - gluco - 4 - enepyranosyluronic acid) D - glucose dari asam hyaluronat per menit (Pritchard,dkk.1994).

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Hewan dan Biomedis PAU Bioteknologi IPB, Laboratorium Immunologi dan Produksi Bahan Hayati, FKH IPB, dan Laboratorium Terpadu FKH.

Test Agar Hyaluronidase (Christ,1989)

Uji ini bertujuan untuk menentukan isolat yang menghasilkan hyaluronidase. Media tumbuh adalah terdiri dari 100 ml BHI ditambahkan 1 g Nobel Agar, kemudian disteril dengan autoklaf. Selanjutnya ditambahkan 50 mg asam hyaluronat dalam 25 ml akuades dan 1,25 g BSA, dituangkan dalam cawan. Inkubasi selama 24 jam, 37°C. Selanjutnya SGB diinokulasikan dalam media tersebut dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37 °C. Empat isolat SGB yang digunakan merupakan koleksi dari dr.Zinatul Hayati,M.Kes.,Sp.MK., kemudian dilakukan penggenangan dengan asetat 2 M sebanyak 5 ml dan terlihat zona bening disekitar koloni SGB (zona bening mengindikasikan isolat SGB tersebut mengekskresikan hyaluronidase).

Isolasi Hyaluronidase pada Supernatan

Setelah diperoleh isolat SGB yang menghasilkan hyaluronidase maka bakteri ditumbuhkan pada 50 ml THB , diinkubasi pada suhu 37 °C, selama kurang lebih 5 jam (nilai absorbansi 0,8 pada λ 650 nm). Selanjutnya diinokulasikan kembali dalam 500 ml THB (mengandung 0,2% asam hyaluronat), dan diinkubasi semalam pada suhu 37 °C. Untuk mengamati pertumbuhan Streptokokus Grup B, dilakukan pengamatan dengan melihat nilai *optical density* (λ 650 nm) selama masa inkubasi. Dilakukan pengujian pula terhadap aktivitas hyaluronidase dan kadar protein (Bradford 1976), sehingga berdasarkan data tersebut dapat kita tentukan waktu produksi hyaluronidase dari SGB, sebagai patokan untuk produksi selanjumya.

Hyaluronidase diperoleh dengan memisahkan enzim dengan sel bakteri SGB tersebut menggunakan sentrifugasi 4000 rpm, selama 15 menit, suhu 4°C. Supernatan merupakan enzim kasar hyaluronidase. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas hyaluronidase dan penentuan kadar protein enzim (Bradford, 1976).

Pengukuran Konsentrasi Protein (Bradford, 1976)
Konsentrasi protein diukur dengan menggunakan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml. Setiap 100 µl konsentrasi BSA ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml pereaksi Bradford dan diinkubasi selama 5 menit, suhu 37 °C, kemudian diukur absorbansinya pada λ 595 nm. Sehingga didapat kurva standar yang merupakan persamaan garis regresi ($y = ax + b$, dengan nilai r mendekati satu) antara nilai absorbansi sebagai ordinat dan konsentrasi protein BSA sebagai absis.

Dengan metoda yang sama untuk sampel hyaluronidase, yaitu sebanyak 100 µl hyaluronidase ditambahkan 5 mi pereaksi Bradford dan diinkubasi 37 °C, 5 menit, dan dilihat nilai absorbansinya pada λ 595 nm. Selanjutnya untuk mendapatkan kadar protein hyaluronidase tersebut, dengan memasukkan nilai absorbansi tersebut ke dalam persamaan daris yang telah dibuat.

Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase (Bergmeyer, 1987)
Aktivitas hyaluronidase diukur berdasarkan jumlah 2-acetamido-2-deoxy3-0- (β - D - gluco - 4 - enepyranosyluronic acid) - D - glucose dari asam hyaluronat.
Bahan yang diperlukan:

1. Bufer phospat (67 mmol/liter, pH 6,4), pembuatannya dengan melarutkan 66 ml Na_2HPO_4 $2H_2O$ (11,876 g/liter) dengan KH_2PO_4 (9,078g/liter) dalam volume 250 ml.
2. Sodium Chloride (0,15 mol/liter) dengan melarutkan 0,877 g NaCl dengan 100 ml air.
3. Perhloric acid (20%w/v) dengan melarutkan 13 ml $HC1O_4$ (70% w/v) dengan 75 ml air.
4. Hyaluronate lyase standar (1 mg protein/ml; 100 U/liter) 7 mg enzim dalam 7 ml larutan NaCl.
5. Asam hyaluronate 200 mg dalam 1000 ml bufer posat.

Pengendapan dengan Amonium Sulfat
Pengendapan protein dengan amonium sulfat dilakukan dengan metoda Scope (1982). Sebanyak 10 ml supernatan enzim ditambahkan amonium sulfat dengan berbagai kadar berdasarkan kejenuhan (40%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%) untuk mendapatkan kadar amonium sulfat yang optimum. Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit dengan magnetic stirer pada suhu dingin. Setelah semua amonium sulfat larut, didiamkan semalam pada suhu 4°C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari supernatan dengan sentrifius 4000 rpm, 15 menit, 4°C. Endapan ditambahkan bufer pospat pH 6,4 satu kali volume. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas hyaluronidase dan kadar proteinnya. Pengandapan amonium sulfat yang menghasilkan aktivitas tertinggi pada

endapan dan aktivitas yang rendah pada supernatan digunakan sebagai patokan untuk pengendapan selanjutnya..

Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan garam yang tersisa pada proses pengendapan. Kantong dialisis (10.000 MW) dipanaskan selama 30 menit dalam 1 mM EDTA, selanjutnya dilakukan pencucian dengan air bebas ion. Sebanyak 10 ml sampel enzim dimasukkan kedalam kantung dialisis dan diikat dengan benang pada kedua ujungnya. Kantung dimasukkan dalam bufer pospat pH 6,4 dengan volume 100 kali sampel, diagitasi secara perlahan selama 1 jam suhu dingin.

Kromatografi Filtrasi Gel

Pemurnian dengan filtrasi gel bergantung pada perbedaan kemampuan dari berbagai molekul protein enzim memasuki pori-pori yang terdapat pada fase diam. Preparasi kolom yaitu, sebanyak 1,7 gram Sephadex G-100 direndam pada air bebas ion steril dan diaduk secara perlahan selama 30 menit, kemudian didiamkan semalam pada suhu 4°C. Air bebas ion dibuang dan diganti dengan bufer pospat pH 6,4 sebanyak tiga kali dan didiamkan satu jam. Kolom kromatografi menggunakan tabung kromatografi diameter 1 cm, secara perlahan gel dituang kedalam tabung hingga mencapai tinggi 40 cm, diusahakan tidak terjadi gelembung yang terdapat dalam kolom. Kolom diekuilibrasi dengan mengalirkan bufer pospat pH 6,4 sebanyak 200 ml selama semalam, suhu dingin (4°C).

Sebanyak 2 ml hyaluronidase yang telah melalui proses dialisis dimasukkan dengan pipet ke dalam kolom tepat diatas permukaan gel. Bufer yang digunakan untuk elusi ialah bufer posfat pH 6,4, dilakukan fraksinasi dan volume tiap fraksi adalah 2 ml. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas hyaluronidase dan kadar proteinnya pada setiap fraksinya, sehingga diketahui pada fraksi ke berapa yang memiliki aktivitas hyaluronidase yang tertinggi.

SDS-PAGE

Protein hasil pemurnian dianalisa dengan Sodium Dodecyl Sulphate polyachrilamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE). Peralatan elektroforesis yang digunakan adalah tipe vertikal. Elektroforesis SDS-PAGE menggunakan sistem gel diskontinue yang terdiri dari *stacking gel* dan *separating gel.* Marker yang digunakan adalah *High molecular Weight.* Sampel sebanyak 15 µl ditambahkan buffer sampel 10 µl dididihkan selama satu menit sebelum diinjeksikan kedalam sumur. Elektroforesis dijalankan dengan arus 20 mA dan voltage 50 volt. Elektroforesis dihentikan bila pewarna sampel mencapai batas 0,3 - 0,5 cm dibagian bawah gel. Gel direndam didalam pewarna *commasie brilliant blue* sambil diagitasi perlahan selama dua jam, selanjutnya dilakukan pencucian dengan merendam gel pada larutan destainning, sehingga gel bening dan pita terlihat jelas. Pengukuran berat molekul protein enzim hyaluronidase didasarkan pada kurva standar yang diperoleh dari persamaan garis antara berat molekul protein standar dengan nilai mobilitas relatif (Rf)nya. (Smith 1984).

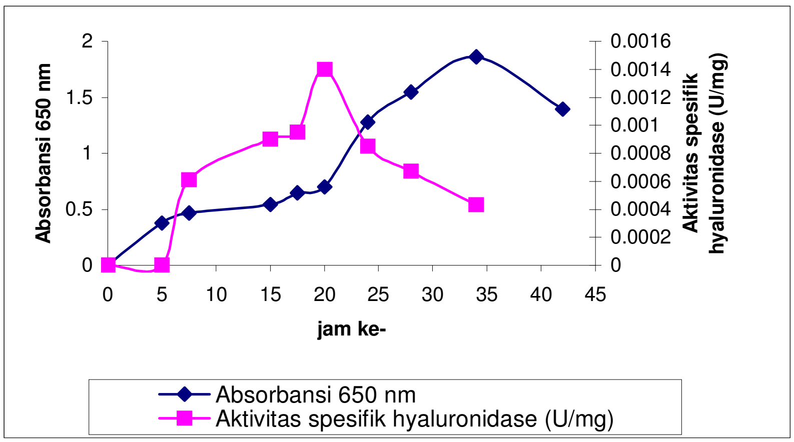
Hasil dan Pembahasan

Penentuan Isolat Streptokokus Grup B (SGB)

Isolat yang telah dideteksi menunjukkan aktivitas hyaluronidase (menunjukkan zona bening) menggunakan test agar hyaluronidase (Christ,1989), selanjutnya dipilih salah satu isolat untuk produksi enzim. Untuk kemudian dilakukan tahap-tahap pemurnian dan karakterisasi dari hyaluronidase yang dihasilkan oleh Streptokokus Grup B tersebut.

Pertumbuhan dan Produksi Hyaluronidase SGB

Pertumbuhan dan produksi hyaluronidase SGB diamati pada media cair THB (ditambah 2% asam hyaluronat). Dilakukan pengamatan terhadap data turbiditas suspensi sel (panjang gelombang 650 nm) yang diukur tiap selang waktu tertentu, disamping itu pula dilakukan pengambilan suspensi sel untuk pengukuran aktivitas hyaluronidase dan kadar proteinnya.



Gambar 1. Pertumbuhan Isolat SV_{14} dan aktivitas spesifik hyaluronidase pada media cair THB suhu 37°C.

Perkembangan produksi protein ekstrasellular mengikuti pola pertumbuhan bakteri SGB tersebut. Terdapat asosiasi antara kurva pertumbuhan dan kurva pembentukan produk dalam hal ini pembentukan protein ektraselular (enzim). Hubungan antara kinetika pertumbuhan sel dengan pembentukan produk tergantung peranan produk dalam metabolisme sel, dalam hal ini- laju pembentukan produk berbanding secara proporsional dengan laju pertumbuhan (Mangunwidjaja,dkk.1994).

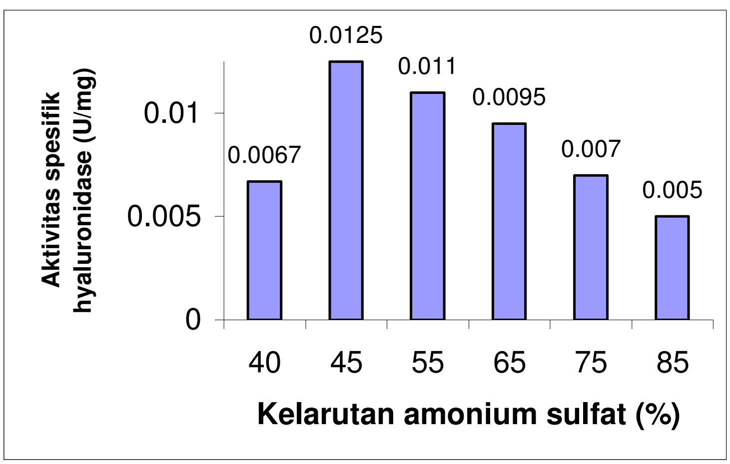
Streptokokus Grup B mengekskresikan hyaluronidase dengan aktivitas tertinggi (0,0012 U/mg) adalah pada saat jam ke-20 masa pertumbuhan bakteri tersebut (fase logaritma pertumbuhan). Data waktu produksi tersebut dapat kita gunakan untuk melakukan produksi enzim dalam skala yang lebih besar. Demikian pula yang dilakukan Pitchard,dkk. (1994) yaitu menumbuhkan Streptokokus Grup B pada media cair selama semalam pada suhu 37°C untuk mendapatkan hyaluronidase dari bakteri tersebut.

Hyaluronidase SGB pada Supernatan

Isolasi hyaluronidae SGB dengan cara memisahkan sel dengan media tumbuh, karena hyaluronidase merupakan enzim ekstraseluler. Hyaluronidase pada supernatan memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,0012 - 0,0018 U/mg. Sebagai pembanding, hasil penelitian yang dilakukan Afify,dkk.(1993) dilaporkan bahwa ekstrak kasar hyaluronidase dari serum manusia memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,009 U/mg.

Pengendapan Amonium Sulfat dan Dialisa

Sebelum dilakukan pemurnian dengan filtrasi gel, hyaluronidase SGB terlebih dahulu dipekatkan menggunakan garam amonium sulfat. Pengendapan menggunakan garam didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi jonik protein dengan garam, dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein (pada pH dan suhu tertentu) meningkat pada kenaikan konsentrasi garam *(salting in).* Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Penambahan garam tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun *(salting out).* Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang akhirnya menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein, sehingga menyebabkan protein saling berinteraksi , beragregasi, dan kemudian mengendap. Amonium sulfat merupakan garam yang paling sering digunakan untuk mengendapkan protein karena memiliki daya larut tinggi didalam air, relatif tidak mahal (Scopes, 1987).



Gambar.2. Pengendapan hyaluronidase SGB dengan amonium sulfat

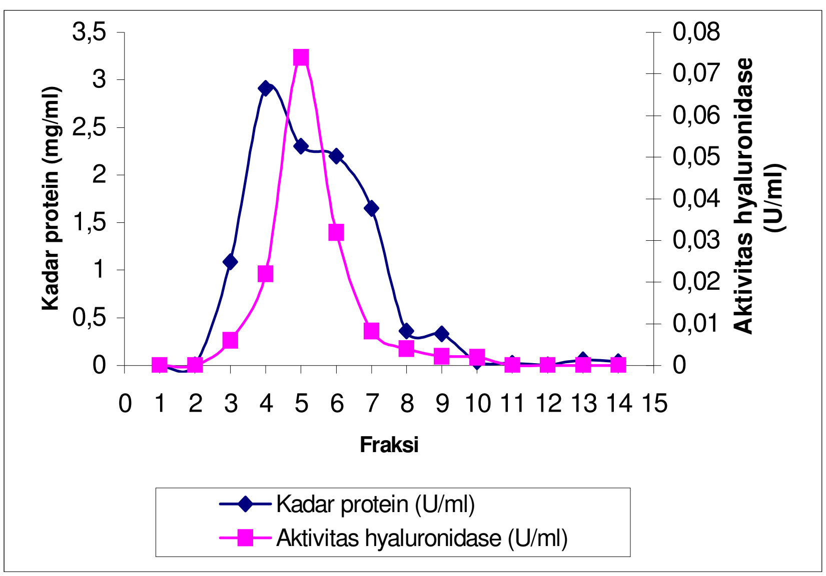
Pengendapan hyaluronidase SGB dengan amonium sulfat 45% menunjukkan aktifitas yang tertinggi pada endapan (pelet) yang dihasilkan. Hal ini diperkirakan hyaluronidase SGB sudah terendapkan *(salting out).* Sedangkan dengan semakin bertambahnya kadar garam dalam larutan sampai pada kelarutan 85% amonium sulfat terjadi kejenuhan yang tinggi, dan mengakibatkan rendahnya endapan dan aktifitas enzim yang diperoleh.

Hyaluronidase SGB hasil pengendapan 45% amonium sulfat digunakan untuk pemurnian tahap selanjutnya. Pengaruh garam mineral dan kelebihan amonium sulfat dalam enzim dihilangkan dengan menggunakan metoda dialisa. Proses penghilangan garam *(desalting)* menggunakan metoda dialisa dilakukan dalam waktu yang tidak terlalu lama (kurang lebih 60 menit) untuk menghindari terjadinya penurunan aktivitas hyaluronidase. Hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas hyaluronidase sebesar 0,0732 U/ml dan kadar proteinnya 5,67 mg/ml, hal ini berarti terjadi penurunan aktivitas spesifik hyaluronidase sebesar 4% dari hasil pengendapan 45% amonium sulfat.

Kromatografi Filtrasi Gel

Pemilihan metode kromatografi kolom didasarkan pada sifat protein enzim yang dipisahkan. Sehingga perlu dilakukan pencarian informasi tentang karakterisasi enzim tersebut, antara lain perkiraan berat molekul, derajat hidrofobisitas, dan adanya ikatan sulfidril.

Hyaluronidase SGB merupakan enzim yang tergolong memilki berat molekul tinggi, menLirut Pitchard,dkk. (1994) berat molekul SGB adalah sekitar 100 kD. Berdasarkan informasi tersebut maka dipilih salah satu teknik pemurnian yaitu kromatografi filtrasi gel. Kromatografi filtrasi gel merupakan teknik pemisahan protein berdasarkan pada ukuran molekul. Matrik filtrasi gel merupakan gel yang berpori yang dikemas dalam kolom . Pori-pori matrik dapat menampung molekul yang berukuran kecil dan memisahkannya dari molekul yang mempunyai berat molekul tinggi, sehingga teknik ini dapat pula digunakan untuk estimasi berat molekul (Scopes, 1987). Protein yang berukuran besar akan keluar terlebih dahulu daripada protein yang berukuran lebih kecil.



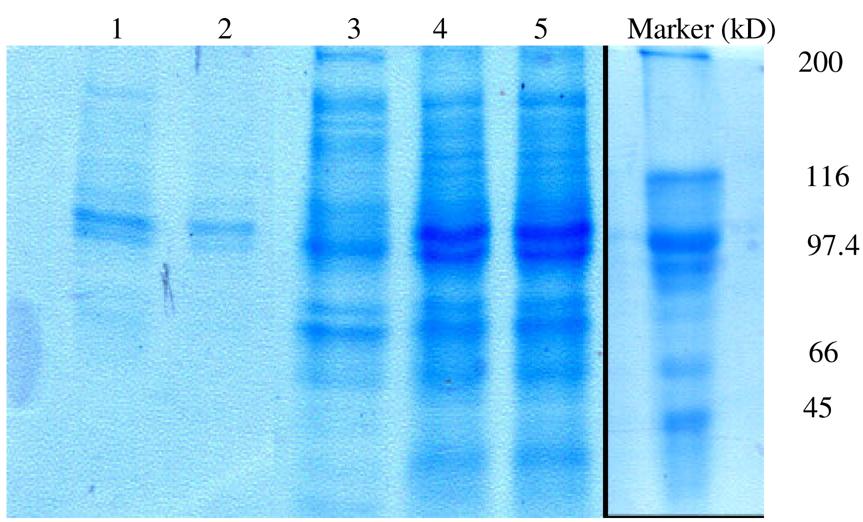
Gambar.3. Profil hasil pemurnian dengan filtrasi gel Sephadex G-100

Hasil kolom Sephadex G-100 menghasilkan satu puncak protein yang melebar. Fraksi yang memiliki aktivitas hyaluronidase yang tertinggi adalah fraksi ke-5 dengan aktivitas spesifik sebesar 0,032 U/mg. Pemurnian hyaluronidase SGB dengan kolom Sephadex G-100 memberikan tingkat kemumian sampai 26,8 kali ekstrak kasar dengan perolehan 12,3%. Perolehan dibawah 50% diperkirakan karena kadar protein yang memiliki aktivitas hyaluronidase lebih rendah daripada protein lain yang diekskresikan sel. Kehilangan protein selama pemurnian dapat terjadi karena autolisis (Scopes 1987), dan hal ini terjadi karena pengaruh pengenceran enzim.

SDS-PAGE

Tingkat kemurnian enzim dapat diketahui dengan menggunakan teknik elektroforesis gel poliakrilmida, SDS-PAGE. Gel disusun oleh akrilamida dan N,N'-metilen - bis - akrilamida yang berpolimerisasi melalui mekanisme radikal bebas dengan bantuan katalisator N,N,N',N',- tetrametilen diamina (TEMED) dan inisiator amoniumpersulfat (APS) (Dunn,1989). Prinsip analisis SDS-PAGE yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul.

Deterjen ionik (SDS) akan bereaksi dengan protein dan membentuk komplek yang mengandung muatan negatif, sehingga pergerakan protein dalam medan listrik hanya didasrakan pada ukuran molekul. Protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan protein berukuran besar. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya dengan cara membandingkan nilai mobilitas relatif (Rf) (Smith, 1984).



Gambar 4. SDS-PAGE hyaluronidase SGB. Fraksi ke 5 pemurnian Sephadex G-100 (1), hyaluronat lyase standar (2), hyaluronidase pada supernatan (3), pengendapan 45% $(NH_4)_2SO_4$ (4), Dialisa (5).

Berdasarkan hasil SDS-PAGE, pada sumur ketiga (3) merupakan hyaluronidase SGB yang diisolasi dari supernatan, terlihat masih banyak terdapat pita-pita protein baik protein yang merupakan hyaluronidase maupun protein dari enzimenzim yang lain. Hal ini terindikasi dengan masih rendahnya aktivitas hyaluronidase. Selanjutnya pada sumur keempat (4) dan kelima (5) merupakan hasil pengendapan dengan 45% $(NH_4)_2SO_4$ (amonium sulfat) dan dialisa. Pengandapan ini bertujuan untuk memisahkan enzim dari senyawa-senyawa yang tidak dikehendaki. Hasil elektroforesis menunjukkan hasil pita-pita yang lebih jelas dibandingkan dengan ekstrak kasar. Hal ini diperkirakan dengan meningkatnya tingkat kemurnian protein enzim tersebut maka terjadi reaksi yang lebih optimum antara protein enzim dengan pewarna *coomassie briliant blue.*

Sedangkan hasil pemurnian dengan kolom Sephadex G-100 menujukkan hasil dua pita yang tersisa (1) dengan berat molekul sekitar 106 kD dan 102 kD. Pita-pita tersebut diperkirakan merupakan hyaluronidase SGB, hal mi ditandai dengan tingginya aktivitas hyaluronidase pada fraksi tersebut. Enzim standar hyaluronat lyase (sumur kedua) menunjukkan satu pita dengan berat molekul yaitu sekitar 100 kD. Hal ini didukung pula dengan hasil penelitian Pitchard,dkk.(1994) bahwa hyaluronidase dari SGB menunjukkan satu pita protein 100 kD. dengan menggunakan SDS-PAGE.

Kesimpulan

Enzim hyaluronidase dari *S. agalactiae* memiliki aktivitas spesifik sebesar 0,0012 U/mg (ekstrak kasar), 0,0125 U/mg (pengendapan dengan 45% ammonium sulfate) and 0,032 U/mg (Gel Filtration). Berat molekul protein hyaluronidase adalah 106 - 102 kD

Ucapan Terimakasih

Terimaksih yang sebesarnya kepada dr.Zainatul Hayati.M.Kes.,Sp.MK yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Bersaing DIKTI dan kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

Daftar Pustaka

Afify.A.M.,Stem. M., G. Markus., S. Robert. 1993. Purification and Characterization of Human Serum Hyaluronidase. Archives of Biochem and Biophysics.305(2):434 -441.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantitaties of protein in utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.72:248-254.

Bergmeyer, H.U. 1987. Method of Enzymatic Analysis. VCH.Vo1.IV:45-49.

Butter,M.N.W and DeMoor,C.E.1967. *Streptococcus agalactie* as Acause of Meningitis in the Newborn and bacteremia in Adults. Antonie van Leeuwenhoek.33;439-450.

Christ.D.1989, Untersuchungen an *Streptococcus uberis* unter besonder Berucksichtigung mutmaBlicher pathogenitatsfatoren. Aus der professur fur Bakteriologie und immunologie der Justus-Universitat GiBen.33-34.

Hynes. W. L.,Dixon. A. R, Walton S.R. Aridgides. L. J .2000. The Extracellular hyaluronidase gene *(hyl A)* of *Streptococcus pyogenes.* FEMS Microbiology Letter 184.109-112.

Kudo.K.Anthony. T.Tu.200L Characterization of Hyaluronidase Isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) Venom. Archives of Biochem and Biophysics. 386(2):154-162.

Mangunwidjaja.D,Suryani.A,1994.Teknologi Bioproses.Penebar Swadaya.Jakarta.

Pritchard.D.G.BoLin.Willingham.T.R,Baker.J.R,1994.Characterization of The Group B Streptococcal Hyaluronate Lyase. Archives of Biochem and Biophysic.315 (2):431-437.

Scopes RK.1987. Protein Purification Principles and Practice. Edisi ke-2. New York: SpringerVerlag.

Smith BJ.1984.SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Di dalam Walker JM,editor. Proteins. Methoda in Molecular Biology. Volume ke-1. Clifton:Humana Pr.hlm *41-55.*

Stephanie M. Borchardt, Betsy Foxman, Donald O. Chaffin, Craig E. Rubens,Patricia A. Tallman, Shannon D. Manning,Carol J. Baker, and Carl F. Marrs.20D4. Comparison of DNA Dot Blot Hybridization and Lancefield Capillary Precipitin Methods for Group B Streptococcal Capsular Typing. J Clin Microbiol. 42(1):146-150.

Toida. T, Ogita Y. Suzuki. A. Toyoda H. Imanari. T. 1999. Inhibition of Hyaluronidase by O-Sulfonated Glycosaminoglycans. Archives of Biochemistry and Biophysics. 3 70(2):176-182.

Wilkinson, H. W. 1978. Group B Streptococcal Infection in Humans. Ann. Rev. Microbio1.32:41-57.