

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI INHIBITOR PROTEASE DARI *Chromohalobacter* sp. 6A3, BAKTERI YANG BERSOSIASI DENGAN SPONGS *Xetospongia testudinaria*

[Purification and Characterization of Protease Inhibitor from *Chromohalobacter* sp. 6A3, Bacteria-associated with Sponge *Xetospongia testudinaria*]

Tati Nurhayati^{1)*}, Maggy T. Suhartono²⁾, Lilis Nuraida²⁾, Sri Budiarti Poerwanto³⁾

¹⁾ Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

³⁾ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

Diterima 26 November 2009/ Disetujui 15 Desember 2010

ABSTRACT

Various sponges has been reported to produce protease inhibitor which could inhibit protease activity of pathogenic bacteria. The previous research showed that bacteria-associated with sponge could produce bioactive compound similar to their host, including protease inhibitor. The purposes of this research were to purify protease inhibitor from *Chromohalobacter* sp. 6A3 and to study the characteristics of the protease inhibitor. The result showed that the protein can be extracted by 30 % (v/v) acetone, purified by gel filtration (Sephadex G-75) and finally, purified by anion exchanger (Sephadex A-50). The molecular weight of the purified protease inhibitor after gel filtration was estimated as 21,31 kDa and 17,05 kDa, but anion exchanger gave protein with estimated molecular weight of 21,31 kDa. The optimum temperature and pH were 30 °C and 5 respectively. The protease inhibitor could resist heating at 30 °C for 10 minutes. Incubation of the inhibitor at 30 °C, pH 5, still retained its activity until 3 hours. The purified enzyme inhibitor was also still active after incubated at pH from 5 to 6 for 1 hour. The most susceptible substrate (enzyme) for the inhibitor was protease from *P. aeruginosa*. The protease inhibitor was inhibited by metal ions except Na⁺ 1mM. Activity of the inhibitor increased twofold by SDS 5 mM. IC₅₀ of the protease inhibitor was 3.48 nM. The protease inhibitor inhibited the enzyme uncompetitively.

Key words: *chromohalobacter*, protease inhibitor, sponge

PENDAHULUAN

Bakteri patogen dalam menjalankan aksinya menggunakan beberapa cara, yang dikenal dengan istilah faktor virulensi, antara lain dengan protease. Mengingat pentingnya protease dalam mekanisme penyebab penyakit maka dalam dasawarsa terakhir ini perhatian terhadap protease sebagai target senyawa obat bagi penyakit asal bakteri (seperti pneumonia, kolera, typhus, gonorrhoe), virus (seperti influenza dan HIV), dan malaria serta kanker, bahkan penyakit degeneratif seperti *Alzheimer* meningkat pesat. Saat ini sudah banyak obat-obatan yang mekanisme kerjanya menghambat kerja protease. Namun peneliti terus melakukan penelitian untuk mencari inhibitor protease alami dari berbagai sumber seperti bakteri, fungi, juga organisme laut, seperti spons, tunikata dan lain-lain. Diantara organisme laut yang ada, spons merupakan penghasil komponen bioaktif terbanyak (Mayer dan Lehmann 2000), termasuk di dalamnya senyawa inhibitor enzim (Lee *et al.*, 2001).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons juga menghasilkan komponen bioaktif (Webster *et al.*, 2001). Hal ini dimungkinkan mengingat jumlah antara koloni bakteri dan cyanobacteria yang ada di spons, terutama *Aplysina aerophoba*, bisa mencapai 40% dari

biomasa spons (Ahn *et al.*, 2003). Mikroorganisme tersebut membentuk suatu simbiotik dengan spons baik di dalam inti sel, di dalam sel, di dalam spons, maupun di luar spons. Hubungan simbiotik ini bisa dilakukan mengingat spons merupakan hewan yang makan dengan cara menyaring makanan dan dikenal dengan istilah *filter feeder*, dalam hal ini mikroorganisme dapat menjadi nutrisi bagi spons.

Lee *et al.* (2001) melaporkan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis simbiotiknya sehingga kemungkinan bahwa spons mengandung komponen bioaktif yang sama dengan simbiotiknya sangat besar. Sebagai contoh *Micrococcus* sp. menghasilkan komponen diketopiperazin, yang sebelumnya telah dilaporkan dihasilkan oleh spons inangnya yaitu *Tedania ignis* (Stierle *et al.*, 1988). Simbion bakteri yang lain, yaitu *Vibrio* sp. memproduksi bifenil eter bromina, yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu *Dysidea* sp. (Elyakov *et al.*, 1991).

Simbiotik *Vibrio* sp. menghasilkan komponen bioaktif berupa peptida yang bersifat anti Bacillus yang juga dihasilkan oleh inangnya yaitu ekstrak spons *Hyatella* sp. (Oclarit *et al.*, 1994). Flowers *et al.* (1998) melaporkan bahwa simbion spons *Oscillatoria spongeliae*, mengandung senyawa diketopiperazin klorina yang juga dihasilkan oleh inangnya, yaitu *Dysidea herbacea*.

Informasi tersebut menunjukkan bahwa sudah cukup banyak simbion spons yang teridentifikasi positif menghasilkan komponen bioaktif yang sama dengan inangnya, diantaranya

* Korespondensi penulis :

E-mail : nurhayati7870@yahoo.com

adalah inhibitor protease berupa protein yang dihasilkan oleh simbiosis spons *Xestospongia testudinaria*, yaitu *Chromohalobacter* sp. 6A3 (Nurhayati *et al.*, 2006).

Aktivitas komponen bioaktif, termasuk inhibitor protease, umumnya menjadi lebih aktif jika berada dalam kondisi murni. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memurnikan dan mengkarakterisasi inhibitor protease dari *Chromohalobacter* sp. 6A3 yang bersifat halofilik (masih dapat hidup pada konsentrasi NaCl 50 %). Disamping itu dalam rangka memanfaatkan potensi yang ada di perairan Indonesia, khususnya di Laut Kepulauan Seribu, serta dalam rangka menyediakan produk biomedis alamiah (inhibitor enzim) yang terkarakterisasi dengan baik dan berpotensi komersial tinggi, maka penelitian untuk menemukan inhibitor protease yang murni merupakan suatu langkah awal yang baik.

METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri penghasil protease, yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, yang diperoleh dari Rumah Sakit Pusat Pertamina, Jakarta; serta *Chromohalobacter* sp. 6A3, bakteri yang diisolasi dari spons *Xestospongia testudinaria* sebagai penghasil inhibitor protease.

Produksi inhibitor protease

Media yang digunakan terdiri atas *special peptone* 0,5 % (w/v), *yeast extract* 0,1 % (w/v), *trace element* 0,2 % (v/v), NaCl 2 % (w/v), glukosa 0,05 % (w/v). Tahap propagasi dilakukan pada suhu 30 °C dengan kecepatan 150 rpm hingga mencapai fase logaritmik. Setelah itu dilakukan kultivasi selama 12 jam pada kondisi yang sama.

Ekstrak kasar didapatkan dengan cara melakukan sentrifugasi terhadap sampel yang diambil pada kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Analisis terhadap ekstrak kasar meliputi penentuan konsentrasi protein (metode Bradford) (Hammond dan Kruger, 1988), dan aktivitas inhibitor protease (modifikasi Imada *et al.*, 1985c diacu dalam Nurhayati *et al.*, 2006). Sebagai substrat digunakan protease dari *P. aeruginosa* yang diproduksi menurut Baehaki *et al.* (2008).

Pemurnian inhibitor protease

Ekstraksi inhibitor protease

Ekstrak kasar selanjutnya diekstraksi menggunakan aseton dan ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Konsentrasi aseton yang ditambahkan 20-60 % (v/v), sedangkan konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan adalah 50-80 % kejenuhan (w/v). Proses ekstraksi dilakukan pada suhu di bawah 4 °C. Ekstrak kasar yang sudah diendapkan dengan dua jenis bahan tersebut, selanjutnya disimpan selama 1 malam pada suhu 4 °C. Tahap selanjutnya adalah sentrifugasi pada suhu 4 °C, kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit.

Pengamatan meliputi penentuan konsentrasi protein (mg/ml) dan aktivitas inhibitor protease (U/ml) (Imada, 1985c) baik pada supernatan maupun pada pelet.

Pemurnian inhibitor protease

Inhibitor protease hasil pengendapan dipekatkan 100x agar memenuhi persyaratan konsentrasi protein minimum untuk dapat dimurnikan dengan kolom kromatografi. Pemurnian dilakukan 2 tahap, tahap pertama menggunakan metode filtrasi gel dan tahap kedua menggunakan penukar ion. Pemurnian dengan filtrasi gel dilakukan dengan bahan pengelusi yaitu bufer TrisHCl pH 5, sedangkan matriknya adalah Sephadex G-75. Fraksi dengan aktivitas tinggi dikumpulkan untuk selanjutnya dimurnikan dengan penukar ion. Konsentrasi NaCl yang digunakan adalah 0,6 M. Matrik yang digunakan Sephadex A-50. Masing-masing fraksi diuji konsentrasi protein (mg/ml) dengan metode Bradford dan aktivitasnya diuji dengan metode Imada *et al.* (1985c).

Karakterisasi inhibitor protease

Karakterisasi dasar inhibitor protease

Karakterisasi dasar inhibitor protease meliputi penentuan suhu optimum (10-70 °C dengan interval 10 °C), pH optimum (3-12), kestabilan panas (10-70 °C dengan interval 10 °C selama 10 menit), kestabilan panas pada kondisi optimum (suhu dan pH optimum selama 8 jam dengan interval waktu 1 jam), ketahanan pH (3-12 dengan interval 1 selama 1 jam pada suhu 30 °C), pengaruh berbagai substrat (protease *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. hydrophilla*, *Listeria* spp., dan *P. aeruginosa*), dan pengaruh ion logam terhadap aktivitas inhibitor protease (ion logam yang digunakan berasal dari garam NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1 dan 5 mM). Pada analisis ini aktivitas inhibitor protease setelah diberi perlakuan diukur aktivitasnya sesuai prosedur Imada *et al.* (1985c) yang diacu dalam Nurhayati *et al.* (2006).

Penentuan IC_{50} inhibitor protease

Definisi IC_{50} adalah besarnya konsentrasi inhibitor protease yang dapat menghambat aktivitas protease sebesar 50 %. Analisis ini dilakukan dengan assay aktivitas inhibitor protease menggunakan substrat (protease dari *P. aeruginosa*) pada konsentrasi protein inhibitor protease yang bervariasi. Prosentase (%) penghambatan dihitung menurut Imada *et al.* (1985c).

SDS PAGE dan zimogram inhibitor protease

Penentuan bobot molekul dilakukan menggunakan SDS PAGE (Laemmli, 1970). Konsentrasi akrilamid yang digunakan dalam analisis ini adalah 10 % (w/v). Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan perak. Pada penelitian ini digunakan marker (penanda) dengan bobot molekul yang berbeda, yaitu meliputi phosphorilase b (*rabbit muscle*) sebesar 97 kDa, albumin (*bovine serum*) 66 kDa, ovalbumin (*chicken egg white*) 45 kDa, karbonat anhidrase (*bovine erythrocyte*) 30 kDa, tripsin inhibitor (*soybean*) 20,1 kDa, dan α -laktalbumin (*bovine milk*) 14,4 kDa.

Zimogram yang digunakan untuk melihat penghambatan adalah menggunakan modifikasi metode Granelli-Piperno dan Reich (1978). Perbedaan antara zimogram dengan SDS PAGE adalah pada gel akrilamid ditambah substrat kasein 2 % (w/v). Enzim protease direaksikan dengan inhibitor protease dengan berbagai konsentrasi. Pewarna yang digunakan untuk keperluan ini adalah *coomassie brilliant blue*.

Penentuan model penghambatan

Model penghambatan aktivitas protease oleh inhibitor ditentukan dengan melakukan variasi substrat (kasein), yaitu 0,75-3,0 % (w/v) dengan interval 0,25. Dengan melakukan plot antara $1/[S]$ dengan $1/v$, maka akan didapatkan nilai K_m dan V_{maks} . Nilai ini akan menentukan model penghambatan inhibitor terhadap protease (Copeland, 2005).

Mekanisme penghambatan

Penentuan mekanisme penghambatan inhibitor protease dilakukan dengan cara mengamati pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dalam media LB yang ditambahkan inhibitor protease pada konsentrasi berbeda. Pada penentuan ini terdapat kontrol, yaitu dalam kultur bakteri tersebut tidak ditambahkan inhibitor protease. Pengamatan dilakukan 1 jam sekali sampai pengamatan kelima, selanjutnya diamati tiap 30 menit selama 9,5 jam. Analisisnya meliputi OD dan aktivitas protease (Bergmeyer *et al.*, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi inhibitor protease

Pada penelitian ini digunakan 2 bahan pengekstrak, yaitu amonium sulfat (50-80 % kejenuhan) dan aseton (20-60 % v/v). Berdasarkan hasil penelitian seperti disajikan pada Tabel 1 dan 2 dapat dilihat bahwa ekstraksi inhibitor protease dapat dilakukan baik dengan amonium sulfat maupun aseton, namun aktivitas spesifiknya jauh lebih tinggi bila menggunakan aseton.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa konsentrasi optimum untuk mengendapkan inhibitor protease dengan amonium sulfat adalah 50 % kejenuhan, dengan nilai aktivitas spesifik 153,085 U/mg dan rendemen sebesar 692,978 %. Pengendapan dengan aseton, maksimum pada konsentrasi aseton 30 % (v/v) dengan aktivitas spesifik sebesar 211,951 U/mg dan rendemen sebesar 959,45 % (Tabel 2). Dengan demikian ekstraksi yang paling baik adalah dengan aseton 30 % (v/v). Ini berarti bahwa inhibitor protease dapat diekstrak dengan baik dengan memanfaatkan sifat yang tidak saling larut antara aseton (nonpolar) dan molekul air (polar).

Penambahan aseton ke dalam larutan protein akan mengurangi kelarutan air terhadap residu hidrofilik inhibitor protease, sehingga terjadi penurunan konstanta dielektrikum pelarut. Posisi air disekitar daerah hidrofobik dari permukaan protein akan digantikan oleh pelarut aseton dan segera terjadi interaksi hidrofobik. Pada pengendapan dengan aseton,

peristiwa pengendapan terjadi karena adanya interaksi elektrostatis antara muatan yang berlawanan pada permukaan protein. Interaksi itu akan menyebabkan protein berada pada kondisi isoelektrik, kemudian beragregasi dan akhirnya mengendap. Pengendapan dengan aseton ini biasa dilakukan untuk mengisolasi protein yang kaya akan residu hidrofobik yang lokasinya di sekitar membran (Scopes, 1987).

Tabel 1. Pengendapan inhibitor protease dengan amonium sulfat

% kejenuhan	Aktivitas inhibitor (U/ml)	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik inhibitor (U/mg)	Yield (%)
0%	1,94	0,088	22,091	100,0
50%	14,39	0,094	153,085	692,9
60%	16,92	0,150	113,177	512,3
70%	24,00	0,198	121,212	548,7
80%	12,62	0,216	58,426	264,5

Tabel 2. Pengendapan inhibitor protease dengan aseton

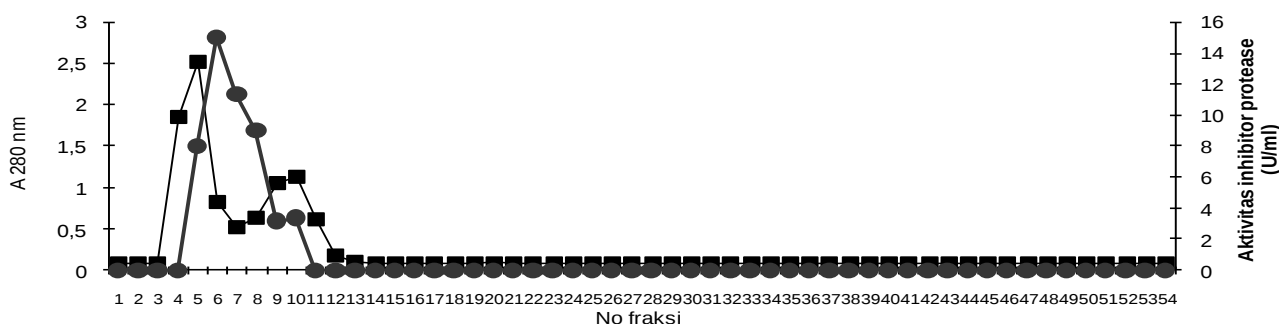
% aseton	Aktivitas inhibitor (U/ml)	Konsentrasi protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik inhibitor (U/mg)	Yield (%)
0%	1,944	0,088	22,091	100,0
20%	6,56	0,077	85,195	385,7
30%	17,38	0,082	211,951	959,5
40%	12,93	0,088	146,932	665,1
50%	10,72	0,094	114,043	516,2
60%	8,47	0,103	82,184	372,0

Pemurnian inhibitor protease dengan kolom kromatografi

Pemurnian inhibitor protease dilakukan dengan 2 tahap, tahap pertama filtrasi gel menggunakan matrik Sephadex G-75 dan tahap kedua penukar ion menggunakan matrik Sephadex A-50.

Prinsip pemurnian dengan filtrasi gel adalah pemisahan protein berdasarkan ukuran partikel. Ada berbagai macam matrik yang digunakan untuk keperluan ini, diantaranya Sephadex G-75. Melalui teknik ini diharapkan inhibitor protease akan terpisah dengan baik berdasarkan ukuran partikel (Jahnsen dan Ryden, 1998).

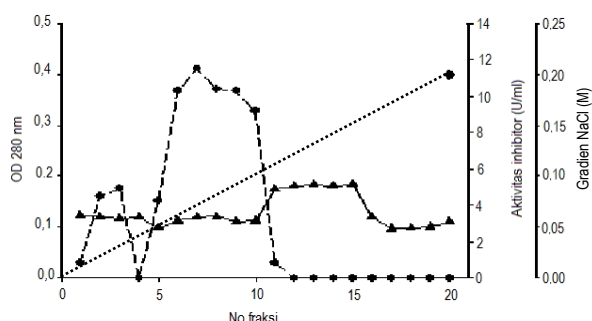
Hasil pemurnian dengan filtrasi gel disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan grafik tersebut dapat dilihat bahwa terdapat 1 puncak aktivitas inhibitor protease yaitu pada fraksi 7, dengan fraksi aktif pada fraksi 5-8. Fraksi 7 mempunyai aktivitas inhibitor sebesar 15 U/ml. Pada fraksi tersebut konsentrasi protein sebesar 0,0089 mg/ml.



Gambar 1. Pemurnian inhibitor protease menggunakan filtrasi gel -●- aktivitas inhibitor protease (U/ml), -■- konsentrasi protein (mg/ml)

Frakasi aktif (fraksi 5-8) dicampur, selanjutnya dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi penukar ion. Fase Bergeraknya adalah buffer TrisHCl, sedangkan fase diamnya adalah DEAE Sephadex A-50. Selain itu juga digunakan NaCl bergradien 0-0,5 M. Penukar ion ini mempunyai matrik Sephadex G-50, dan gugus fungsional DEAE. Bila menggunakan penukar ion tersebut, ikatan terbesar yaitu ketika kekuatan ioniknya rendah dan akan menyusut menjadi 0,5 volume ketika kekuatan ion meningkat dari 0,01 menjadi 0,5M (Jahnsen dan Ryden, 1998).

Hasil pemurnian inhibitor protease dengan kromatografi penukar ion disajikan pada Gambar 2. Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa terdapat 2 puncak, puncak pertama berada pada fraksi 2 dan 3 dengan aktivitas yang rendah yaitu sebesar 4,512 dan 4,923 U/ml, sementara itu puncak kedua berada pada fraksi 6-10 dengan puncak tertinggi pada fraksi 7 dengan aktivitas inhibitor sebesar 11,520 U/ml dan konsentrasi protein sebesar 0,0018 mg/ml.



Gambar 2. Pemurnian inhibitor protease menggunakan penukar ion
▲ OD 280 nm; ● aktivitas inhibitor protease (U/ml); ◆ gradien NaCl (% w/v).

Peningkatan aktivitas inhibitor protease pada berbagai tahapan pemurnian disajikan pada Tabel 3. Ekstrak kasar yang dihasilkan mempunyai aktivitas spesifik sebesar 90,546 U/mg. Ekstrak kasar selanjutnya diendapkan dengan aseton 30 % (w/v) yang dilarutkan dengan buffer pH 5. Endapan tersebut mempunyai spesifik sebesar 1.176,5 U/mg dengan kelipatan pemurnian 12,99 kali.

Endapan selanjutnya dimurnikan dengan Sephadex G-75 sehingga diperoleh aktivitas spesifik sebesar 1.278,5 U/mg dengan kelipatan pemurnian 14,12 kali. Tahap akhir pemurnian adalah dengan penukar ion. Hasilnya menunjukkan peningkatan aktivitas spesifik yang cukup tinggi, yaitu menjadi 6.400 U/mg dengan kelipatan pemurnian 70,68 kali.

Imada *et al.* (1985a) memurnikan inhibitor protease dari *Alteromonas* sp. jenis monostatin menggunakan Sephadex G-100 dengan aktivitas spesifik 355,56 U/mg. Imada *et al.* (1986) berhasil memurnikan jenis inhibitor protease yang lain (marinostatin) dari bakteri yang sama. Setelah melalui beberapa

tahap pemurnian didapatkan 4 jenis marinostatin, yaitu marinostatin B-1 (1.304,33 U/mg), marinostatin B-2 (2.206,80 U/mg), marinostatin C-1 (3.697,78 U/mg), dan marinostatin C-2 (3.408,89 U/mg). Kim *et al.* (1995) telah berhasil memurnikan inhibitor protease dari *Serratia marcescens* melalui beberapa tahap pemurnian. Pada tahap akhir pemurniannya dengan superose 6HR menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas spesifik 6.096 U/mg. Sepcic *et al.* (1997) melaporkan bahwa inhibitor kolinesterase berhasil dimurnikan dengan kelipatan kemurnian 85,3 kali dan aktivitas inhibitor murni mempunyai aktivitas spesifik 705 U/mg.

Karakteristik inhibitor protease

Karakteristik dasar inhibitor protease

Karakteristik inhibitor protease isolat 6A3 dan beberapa inhibitor protease lainnya disajikan pada Tabel 4. Tabel tersebut menunjukkan bahwa beberapa inhibitor protease yang dihasilkan oleh mikroorganisme, mempunyai sifat serin metaloprotease (inhibitor asal isolat 6A3), thiol protease (inhibitor monostatin asal *Alteromonas* sp.), serin protease (inhibitor marinostatin asal *Alteromonas* sp.) serta metaloprotease (inhibitor asal *S. marcescens* dan *Streptomyces* sp.).

Senyawa tersebut mempunyai berat molekul tinggi (>10 kD) dan beberapa berberat molekul rendah (<10kD), mempunyai suhu optimum berkisar 20-30 °C, bekerja pada kisaran pH yang luas.

Inhibitor protease dari isolat 6A3 dihambat oleh beberapa logam namun diaktifkan oleh satu logam, yaitu Na⁺. Masing-masing inhibitor protease mempunyai spesifisitas substrat tertentu, seperti inhibitor protease dari isolat 6A3 mempunyai substrat spesifik, yaitu protease dari *P. aeruginosa*. Hal ini dapat dihubungkan dengan kekerabatan yang cukup dekat antara *Chromohalobacter* sp. dengan *Pseudomonas* sp. yang digambarkan dengan pohon filogenetik dan berdasarkan uji kemiripan DNA antara keduanya menunjukkan nilai 92 % (Nurhayati *et al.*, 2006).

Umumnya suatu bakteri dapat menghambat bakteri lain jika masih dekat jenisnya. Ternyata ini berlaku pada inhibitor protease yang dapat menghambat protease yang berasal dari bakteri yang mempunyai kekerabatan yang dekat.

Potensi inhibitor protease dibandingkan dengan inhibitor komersial

Potensi suatu inhibitor protease dari isolat 6A3 dapat dilakukan dengan cara membandingkan dengan inhibitor komersial, dalam hal ini *ethylene diamin tetra acetic* (EDTA) dan *phenyl methyl sulfonyl fluoride* (PMSF) pada konsentrasi 1 mM dan 5 mM. Sementara itu konsentrasi inhibitor protease dari 6A3 adalah 5×10^{-4} mM.

Tabel 3. Peningkatan aktivitas inhibitor protease pada berbagai tahapan pemurnian

Tahap pemurnian	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas Inhibitor (U/ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivitas (U)	Akt. Spes. (U/mg)	Yield (%)	Kelipatan pemurnian
Ekstrak kasar	1000 l	0,0641	5,804	64,1	5.804	90,546	100	1
Aseton	45	0,0520	61,18	2,34	2.753,1	1.176,5	47,43	12,99
Filtrasi gel	3	0,0089	11,336	0,0266	34,008	1.278,5	0,586	14,12
Penukar ion	2	0,0018	11,52	0,0036	23,04	6,4	0,397	70,68

Hasil pengujian menunjukkan bahwa inhibitor protease dari isolat 6A3 mempunyai aktivitas penghambatan terhadap protease *P. aeruginosa* 10.000-20.000x dibandingkan dengan PMSF, dan 5.000-10.000x dibandingkan dengan EDTA. Data mengenai potensi inhibitor protease dari isolat 6A3 dibandingkan dengan EDTA dan PMSF disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbandingan aktivitas inhibitor protease dari isolat 6A3 dengan PMSF dan EDTA

No	Jenis inhibitor	Konsentrasi inhibitor	Aktivitas inhibitor (U/ml)
1	Inhibitor 6A3	0,5 μ M	5,008
2	EDTA	1 mM	9,574
		5 mM	10,538
3	PMSF	1 mM	5,141
		5 mM	5,012

IC₅₀ inhibitor protease

Inhibitory concentration (IC)₅₀ artinya adalah konsentrasi inhibitor yang dapat menghambat enzim sebesar 50 % (Takasaki *et al.*, 2004). Gambar 3 digunakan untuk menghitung IC₅₀ pada inhibitor hasil filtrasi gel.

Hasil perhitungan menunjukkan persamaan $Y = 53,522 X + 10,949$; dimana Y adalah % penghambatan, sedangkan X adalah konsentrasi protein inhibitor yang dapat menghambat protease. Berdasarkan persamaan itu maka didapatkan penghambatan 50% berada pada konsentrasi 73 ng/ml atau 3,48 nM.

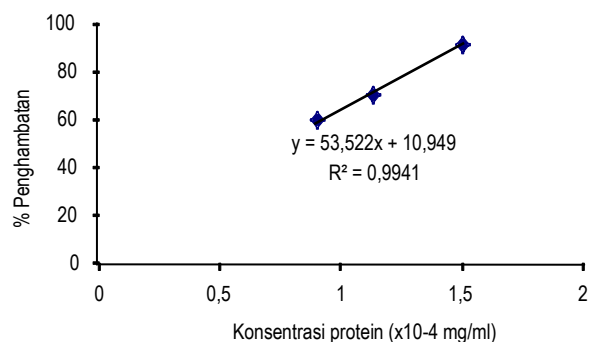
Inhibitor protease jenis antileukoprotease mempunyai nilai IC₅₀ 9,5 nM. Inhibitor protease HIV-1 yaitu KNI 122 mempunyai nilai IC₅₀ 100nM, sementara inhibitor HIV-1, yaitu SP346, mempunyai nilai IC₅₀ 600 nM (Zoilner, 1993).

Inhibitor yang dihasilkan oleh *Chromohalobacter* sp. QS3666 mempunyai nilai IC₅₀ kurang dari 0,4 μ M. Baum *et al.* (2001) melaporkan inhibitor enzim yang dihasilkan oleh *E. coli* mempunyai nilai IC₅₀ 0,2-0,9 μ M dalam menghambat enzim MurA yang diperlukan untuk biosintesis dinding sel.

Spons laut jenis *Halicondria* sp. menghasilkan inhibitor fosfatase dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,1-0,5 nM terhadap

fosfatase rantai terang dari miosin yang terfosforilasi, dan 1 nM terhadap fosfatase *polycation-modulated* (Bialojan dan Takai, 1988).

Inhibitor HIV reverse transcriptase yang dihasilkan oleh sponge laut *Irchinia* sp. ada 2 jenis yaitu 2-hexaprenilhidro-kuinon (HPH) yang menunjukkan penghambatan yang umum terhadap HIV reverse transcriptase (HIV1, HIV2 dan virus leukemia murin) dengan nilai IC₅₀ 0,8-11 μ M dan mHPH (HPH yang termetilasi) dengan nilai IC₅₀ 7,1-105 μ M (Loya *et al.*, 1997).



Gambar 3. Penentuan IC₅₀ inhibitor protease murni

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa konsentrasi penghambatan sebesar 50 % pada hasil filtrasi gel mempunyai nilai yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak kasar. Ini menunjukkan bahwa pemurnian menurunkan konsentrasi yang digunakan untuk menghambat aktivitas protease, dalam hal ini protease *P. aeruginosa*.

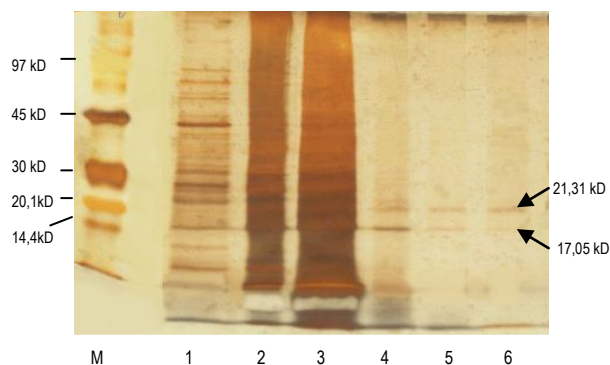
Bobot molekul inhibitor protease

Penentuan bobot molekul dilakukan dengan teknik SDS PAGE (*Sodium dedocyl sulphates-polyacrylamide gel electrophoresis*) menggunakan metode Laemlli (1970) dengan metode pewarnaan perak. Hasil penentuan bobot molekul disajikan pada Gambar 4 dan 5.

Tabel 4. Karakteristik umum inhibitor protease isolat 6A3 dan beberapa inhibitor protease lainnya

Karakteristik	Isolat 6A3	<i>Serratia marcescens</i> ¹	<i>Alteromonas</i> sp.		<i>Streptomyces</i> sp. ⁴
Jenis inhibitor	Inhibitor serin metallo protease	SMPI	Monostatin ²	Marinostatin ³	FMPI
Suhu optimum	30°C			20°C	25°C
pH optimum	5	TD	TD	TD	TD
Kisaran pH	3-8	3-12	2-12	2-10	>11
Stabilitas panas	50°C, 10 menit	60°C, 30 menit		80°C, 10 menit	TD
Stabilitas panas pada kondisi optimum	5 jam, 30°C	85°C	100°C, 30 menit	TD	TD
Kestabilan pH pada suhu optimum	5-6	3-12, 1 jam	TD	4-6, 10 menit	>11
Pengaruh logam	Diaktifkan oleh Na ⁺ 1 mM, dihambat K ⁺ , Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ³⁺	Tidak dihambat Zn ²⁺	Dihambat oleh Cu ²⁺ , Fe ²⁺	Dihambat Co ²⁺ dan Fe ²⁺	TD
Spesifisitas substrat	Protease <i>P. aeruginosa</i>	Spesifik terhadap SMP	Thiol protease (papain, ficin)	α -chymotrypsin	metalloprotease

¹ Kim *et al.* (1995), ² Imada *et al.* (1985a), ³ Imada *et al.* (1985b), ⁴ Murao *et al.* (1982)



Gambar 4. Elektroforesis I: (M) Marker, (1) *Crude extract*, (2) Pengendapan aseton, (3) *Freeze drying*, (4) Filtrasi gel, (5) Filtrasi gel 2, (6) Filtrasi gel 3

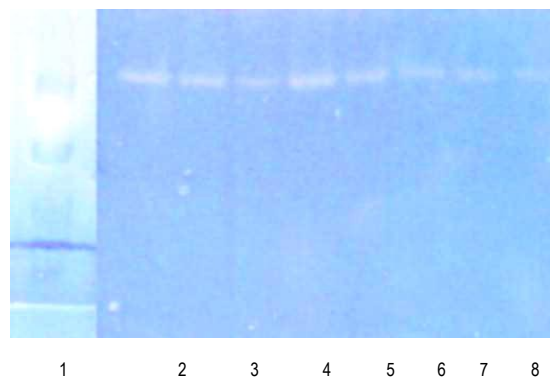


Gambar 5. Elektroforesis III: (M) Marker, (1-2) Filtrasi gel, (3-7) penukar ion

Berdasarkan Gambar 4, nampak bahwa inhibitor protease masih mempunyai banyak pita (8 buah), yang berarti bahwa masih banyak molekul yang terdapat disini, termasuk pula protein yang berasal dari sel dan protein pengotor lainnya. Setelah mengalami pengendapan terdapat pemekatan yang ditandai oleh tebalnya pita. Ketebalan pita menunjukkan konsentrasi protein yang tinggi. Proses pemurnian dengan filtrasi gel banyak menghilangkan protein sehingga yang tersisa adalah protein inhibitor yang lebih murni. Ini ditandai dengan jumlah pita pada hasil elektroforesis yang berjumlah 2 buah (Gambar 5). Tingkat kemurnian yang paling tinggi didapatkan setelah inhibitor protease dimurnikan dengan penukar ion, pita yang dihasilkan hanya 1 buah dengan bobot molekul 21,31 kDa (Gambar 6). Inhibitor ini termasuk dalam inhibitor berbobot molekul tinggi (Aoyagi dan Takeuchi, 1989).

Alteromonas sp menghasilkan 2 jenis inhibitor yaitu monostatin dan marinostatin. Monostatin merupakan inhibitor berbobot molekul tinggi yaitu 20 kD (Imada *et al.*, 1985a), sedangkan marinostatin merupakan inhibitor protease berbobot molekul rendah yaitu 1,7 dan 0,1 kD (Imada *et al.*, 1985b). Spons laut *Reniera sarai* menghasilkan inhibitor kolinesterase 2 jenis yaitu yang mempunyai bobot molekul rendah (5,52 kD) dan berbobot molekul tinggi (18,9 kD) (Sepcic *et al.*, 1997). *Green Fluorescent Protein* (GFP) yang berasal dari ubur-ubur *Aequorea victoria* dilaporkan mempunyai bobot molekul 27 kDa

(Li *et al.* 1997), hampir sama dengan bobot molekul inhibitor protease dari isolat 6A3.



Gambar 6. Zimogram inhibitor protease: sumur 1 dan 4 (kontrol); sumur 2 dan 5 (hasil pengendapan aseton); sumur 3 dan 6 (inhibitor protease hasil pengendapan aseton); sumur 7 (hasil filtrasi gel); sumur 8 (hasil *ion exchange*). Keterangan: M (Marker); konsentrasi protein inhibitor protease (μ g) 0 (sumur 1); 0,202 (sumur 2); 1,110 (sumur 3); 0 (sumur 4); 0,202 (sumur 5); 1,110 (sumur 6); 0,050 (sumur 7); dan 0,011 (sumur 8)

Zimogram inhibitor protease

Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat perbedaan penghambatan oleh inhibitor protease hasil pengendapan aseton terhadap aktivitas protease *P. aeruginosa* pada konsentrasi protein yang berbeda (0,202 μ g dan 1,110 μ g). Semakin tinggi konsentrasi protein yang digunakan, maka semakin besar penghambatannya. Pada sumur 7 digunakan inhibitor hasil filtrasi gel (konsentrasi protein 0,05 μ g), sedangkan pada sumur 8 digunakan inhibitor protease hasil pemurnian dengan *ion exchange* (konsentrasi protein 0,01 μ g). Pada konsentrasi tersebut sudah menghambat aktivitas protease *P. aeruginosa*.

Model penghambatan

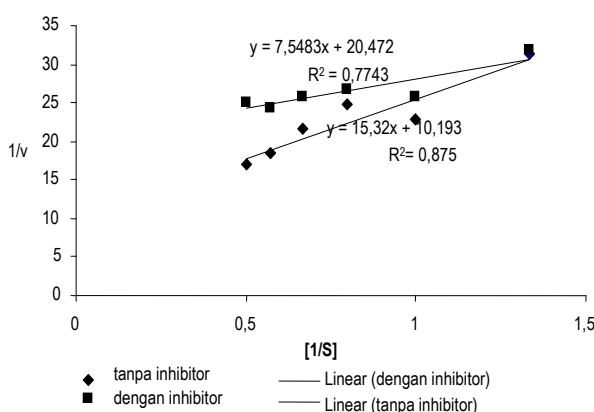
Secara kimiawi, suatu inhibitor tidak dapat dibedakan dari aktivator. Setelah bereaksi dengan enzim, baru diketahui keadaannya. Aktivator, berikatan dengan enzim dan menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim, sedangkan inhibitor, berikatan dengan enzim dan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi.

Ikatan inhibitor dengan enzim dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat, dan karenanya, mengubah kemampuan daya katalisator enzim. Hal ini disebabkan karena struktur enzim yang sudah berikatan dengan inhibitor mengalami perubahan fisik dan kimiawi sedemikian rupa, sehingga, aktivitas hayatinyapun menjadi berubah (terhambat).

Umumnya dikenal tiga jenis penghambatan, yakni penghambatan kompetitif, non kompetitif, dan unkompetitif. Penghambatan kompetitif terjadi karena struktur inhibitor menyerupai struktur substrat, sehingga masing-masing akan bersaing untuk berikatan dengan enzim. Keadaan ini ditandai dengan V_{maks} yang dicapai sama, namun nilai K_m berbeda, yakni lebih besar. Pengaruh inhibitor dapat dihilangkan dengan meningkatkan konsentrasi substrat.

Pada penghambatan non kompetitif, inhibitor akan menurunkan nilai V_{maks} tanpa mengubah nilai K_m substrat yang berikatan dengan enzim. Struktur inhibitor berbeda dengan substrat. Pengikatannya dengan enzim terjadi di luar sisi aktifnya. Penghambatan unkompetitif menyebabkan perubahan nilai K_m dan V_{maks} .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim yang ditambah dengan inhibitor mempunyai kecepatan maksimum 0,0488 U/ml, dan nilai K_m 0,3687, sedangkan enzim yang tidak ditambah inhibitor mempunyai kecepatan maksimum 0,098 U/ml, dengan nilai K_m 1, 503. Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa inhibitor tersebut termasuk ke dalam golongan unkompetitif, karena inhibitor mempunyai kemampuan untuk mengubah nilai K_m dan V_{maks} . Secara lengkap data tersebut disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Model penghambatan inhibitor protease

KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil memurnikan inhibitor protease yang berasal dari isolat 6A3 yang diisolasi dari spons *Xestospongia testudinaria* dengan jenis *Chromohalobacter* sp. 6A3. Tahap penentu pemurnian adalah kromatografi penukar ion yang mampu meningkatkan kelipatan pemurnian hingga 70 kali dengan aktivitas spesifik sebesar 6.400 U/mg.

Inhibitor tersebut menunjukkan IC_{50} sebesar 3,48 nM dan mekanisme penghambatannya ditemukan sebagai unkompetitif, serta termasuk inhibitor berbobot molekul tinggi (21,31 kD). Efektifitas inhibitor protease yang ditemukan lebih efektif, yaitu mempunyai potensi penghambatan 10.000-20.000x dibandingkan dengan PMSF, dan 5.000-10.000x dibandingkan dengan EDTA. Inhibitor tersebut mempunyai suhu dan pH optimum 30 °C dan 5, relatif stabil pada kondisi tersebut, substrat spesifik yaitu protease dari *P. aeruginosa*. Ion-ion logam menurunkan aktivitas inhibitor protease kecuali ion logam Na^+ 1 mM, sebaliknya SDS 5 mM meningkatkan aktivitas inhibitor hingga 100 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jenderal Dikti Depdiknas RI melalui Program Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn YB, Rhee SK, Fennell D, Kerkhof LJ, Hentschel U, Hagglom MM. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Environ Microbiol* 69:4159-4166.
- Aoyagi T, Takeuchi T. 1989. Low molecular weight enzyme inhibitors produced by microorganisms. Di dalam *Novel Microbial Product for Medicine and Agriculture*. Demain AL, Samkuti GA, Hunter JC, Rossmore HW, editor. Elsevier Science Publisher.
- Baehaki A, Suhartono MT, Palupi NS, Nurhayati T. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan* XIX(1):80-86.
- Baum EZ, Montenegro DA, Licata L, Turchi I, Webb GC, Folendo BD, Bush K. 2001. Identification and characterization of new inhibitors of the *Escherichia coli* Mur A enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3182-3188.
- Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Graßl M. 1983. Methods of enzymatic Analysis Vol 2. Weinheim: Verlag Chemie.
- Bialojan C, Takai A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Biochem J* 256:283-290.
- Copeland RA. 2005. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. USA: A John Wiley & Sons, Inc, Publ.
- Elyakov GB, Kuznetsova T, Mikhilov VV, Maltsev II, Bionov VG, Fedoreyev SA. 1991. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. *Experientia* 47:632-633.
- Flowers AE, Garson MJ, Webb RI, Dumdei EJ, Charan RD. 1998. Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). *Cell Tissue Res* 292:597-607.
- Granelli-Pipemo A, Reich E. 1978. A study of protease and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J Exp Med* 148:223-234.
- Hammond JBW, Kruger J. 1988. The bradford method for protein quantitation. Di dalam Walker JM, editor. *New Protein Technique*. Clifton, New Jersey: Humana Press.
- Imada C, Simidu U, Taga N. 1985a. Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor. *Bull Jap Soc Scient Fish* 51:799-803.
- Imada C, Maeda M, Taga N. 1985b. Purification and characterization of the protease inhibitor "monostatin" from a marine *Alteromonas* sp. with reference to inhibitor of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish. *Bull Jap Soc Scient Fish* 51:1089-1094.
- Imada C, Taga N, Maeda N. 1985c. Cultivation conditions for subtilisin inhibitor-producing bacterium and general properties of the inhibitor "marinostatin". *Bull Jap Soc Scient Fish* 51: 805-810.

- Janson JC, Ryden J. 1998. Protein Purification. New York: A John Wiley & Sons, Inc, Publication.
- Kim, KS, Kim TU, Byun SM, Shin YC. 1995. Characterization of a metalloprotease inhibitor protein (SmaPI) of *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol* 61:3035-3041.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 39: 254-264.
- Li X, Zhang G, Ngo N, Zhao X, Kain SR, Huang CC. 1997. Deletions of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein define the minimal domain required for fluorescens. *J Biol Chem* 272:28545-28549.
- Loya S, Rudi A, Kashman Y, Hizi A. 1997. Mode of inhibition of HIV reverse transcriptase by 2-hexaprenyl-hydroquinone, a novel general inhibitor of RNA-and DNA-directed DNA polymerases. *Biochem J* 324:721-727.
- Mayer AMS, Lehmann VKB. 2000. Marine Pharmacology. *The Pharmacol* 42:62-69.
- Murao S, Kasai N, Kimura Y, Oda K. 1982. Isolation of metallo-proteinase inhibitor (FMPI) producing microorganism. *Agric Biol Biochem* 46:2697-2703.
- Nurhayati T, Suhartono MT, Nuraida L, Poerwanto SB. 2006. Karakterisasi awal inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Hayati* 13(2):58-64.
- Osclart JM, Okada H, Ohta S, Kaminura K, Yamaoka Y, Iizuka T, Miyashiro S, Ikegami S. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbiol* 78:7-16.
- Scopes RK. 1987. *Protein Purification, Principles and Practice* edisi ke-2. New York: Springer-Verlag.
- Sepcic K, Guella G, Mancini I, Pietra F, Serra MD. 1997. Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. *J Nat Prod* 60:991-996.
- Stierle AC, Cardellina II JH, Singleton FL. 1988. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* 44:1021
- Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K, Kobori M. 2004. A Novel $G\alpha_{q/11}$ -selective inhibitor. *J Biol Chem* 279:47438-47445.
- Walker JM. 1988. *Methods in Molecular Biology Vol 3: New Protein Techniques*. New Jersey: The Humana Press, Inc.
- Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, Hill RT. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microb* 67:434-444.
- Zoiler. 1993. *Handbook of enzymes inhibitor 2nd*, Revised and enlarge edition part B. Germany: VCH Verlagsgesellschaft.