

Aktivitas Proteolitik *Lactobacillus acidophilus* dalam Fermentasi Susu Sapi (*Proteolytic Activity of Lactobacillus acidophilus in Fermentation of Dairy Cow Milk*)

Wendry Setiyadi Putranto

Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran Bandung

Abstrak

Lactobacillus acidophilus memiliki kemampuan mengekskresikan ekstraseluler protease. Tujuan penelitian dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas proteolitik dari *L. acidophilus*. Enzim protease telah dimurnikan dengan sentrifugasi, pengendapan 45% ammonium sulfat, dan kromatographi. Hasil penelitian menunjukkan Protease *Lactobacillus acidophilus* memiliki aktivitas spesifik 0,752 U/mg (ekstrak kasar), 1,24 U/mg (pengendapan dengan 45% ammonium sulfate) and 1,15 U/mg (Gel Filtration). Protein enzim yang diperoleh sebesar 12,6% ekstrak kasar protease.

Kata kunci: aktivitas proteolitik, pemurnian, *L. acidophilus*

Abstract

Lactobacillus acidophilus is able to produce extracellular protease, the aim of this research was to find out its proteolytic activity. The enzyme was purified using centrifugation, 45% ammonium sulfate precipitation, chromatography column using Sephadex G-100. The result shows that *Lactobacillus acidophilus* protease has specific activity was 0,752 U/mg (crude extract), 1,24 U/mg (purified using 45% ammonium sulfate precipitation) and 1,15 U/mg (Gel Filtration). The purification yield 12,6% extracellular protease from crude extract.

Keywords: proteolytic activity, purification, *L. acidophilus*

Pendahuluan

Protease merupakan enzim yang mampu menghidrolisis ikatan peptida pada protein. Berdasarkan *Nomenclature Comitte of The International Union of Biochemistry*, protease digolongkan dalam enzim hidrolase (EC.3.4). Berdasarkan letak pemecahan peptida protease dapat dibedakan atas dua bagian, yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Eksopeptidase memotong ikatan peptida pada terminal amino atau karboksil dari substrat, sedangkan endopeptidase memotong bagian tengah dari ikatan peptida.

Beberapa penghasil protease komersial antara lain genus *Bacillus* (*B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, dan *B. polymixa*). Kelompok bakteri lain adalah *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, dan *Staphylococcus*. Fungi juga menghasilkan protease yaitu dari genus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Sacharomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Jan Rhizopus* (Rao dkk,1998)

Bakteri asam laktat memiliki kemampuan menghasilkan enzim proteolitik di sekitar dinding sel, membran sitoplasma, atau di dalam sel (Thomas dkk, 1987). *Lactobacillus acidophilus* selama proses fermentasi selain memanfaatkan peptida

atau asam amino bebas untuk pertumbuhannya, bakteri tersebut juga mampu menghidrolisis kasein dengan menggunakan protease yang diekskresikan di sekitar permukaan dinding selnya (Thomas dkk,1987).

Enzim proteolitik yang dihasilkan dari *Lactobacillus bulgaricus* telah diisolasi dan dimurnikan menggunakan kromatografi DEAE-cellulose dan Sephadex G-150, diperoleh enzim murni dan setelah diseparasikan dengan SDS--PAGE menunjukan satu pita protein dengan berat molekul 98.000 Dalton. Enzim tersebut memiliki aktivitas optimum pada pH 6 dan suhu 40°C, spesifisitas terhadap substrat L-lysyl-4-nitroanilide, aktivitasnya dihambat oleh EDTA dan 1,10-phenanthroline, dan diaktifkan oleh kofaktor logam Ca^{2+} . Aminopeptidase (proteolitik) yang diisolasi dan *Streptococcus thermophilus* menggunakan kromatografi DEAE-cellulose dan Sephadex G-150, menghasilkan enzim murni dengan berat molekul 89.000 Dalton, memiliki aktivitas optimum pada pH 6,5 dan suhu 35°C, diaktifkan oleh kofaktor logam Mg^{2+} , dihambat oleh EDTA dan 1,10-phenanthroline (Tsakalidou dkk, 1993).

Satu unit aktivitas protease dapat didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mampu

menghasilkan satu mikromol tirosin per menit. Analisis protease dapat mengikuti metode yang dikemukakan Walter (1984), sedangkan untuk mengetahui berat molekul protein enzim tersebut dapat menggunakan elektroforesis SDS-PAGE metode Laemmli (1970) selanjutnya untuk memastikan bahwa pita protein tersebut merupakan suatu enzim dapat digunakan analisis Zymogram.

Metode

Strain yang digunakan *Lactobacillus acidophilus*, media propagasi menggunakan MRS broth, sedangkan media produksi menggunakan MRS broth dan susu sapi perah. *Lactobacillus acidophilus* dari media padat diinokulasikan pada media propagasi MRS broth (10 ml) inkubasi 37°C, dilakukan pengamatan pertumbuhannya pada 600 nm. Selanjutnya sebanyak 2% (v/v) diinokulasikan pada media produksi MRS broth dan susu sapi perah (UHT). Pengambilan sampel dilakukan tiap jam terhadap kedua media produksi tersebut, dilakukan pengamatan perumbuhan mikrobanya, dan pengukuran aktivitas protease (Walter, 1984) serta kadar protein (Bradford, 1978).

Pengukuran densitas bakteri pada media produksi susu UHT

Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan 9 ml EDTA (2g/l, pH 12) selanjutnya dilihat absorbansinya pada 600 nm (Metoda Kanasaki)

Isolasi ekstrak seluler protease *Lactobacillus acidophilus*

Sampel disentrifugasi 12000 g, pada suhu 4°C, selama 15 menit. Supernatan diambil dan dianalisis kadar protein dan aktivitas proteolitiknya.

Pengukuran konsentrasi protein (Bradford, 1976)

Konsentrasi protein diukur dengan menggunakan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0,1 hingga 1 mg/ml. Sebanyak 100 µl sampel ditambah 5 ml pereaksi Bradford, selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C dan kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada 595 nm

Aktivitas protease dihitung dengan formula:

$$UA = \frac{(A_{sp} - A_{bl})}{(A_{st} - A_{bl})} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

UA = Unit aktivitas enzim (U/menit)

A_{sp} = Nilai absorbansi sampel

A_{st} = Nilai absorbansi standart

A_{bl} = Nilai absorbansi blanko

P = Faktor pengenceran

T = Waktu inkubasi (menit)

Pengendapan dengan Amonium sulfat

Untuk menggumpalkan protein, supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan ammonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan konsentrasi (30%, 40%, 45%, 60%) dan dibiarkan selama satu malam pada suhu 4°C. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 15 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dengan buffer Tris-HCl 10 mM pH 8, kemudian dilakukan pengujian aktivitas proteasenya dengan metode Walter (1984) dan penentuan kadar proteinnya dengan metode Bradford (1976)

Tabel 1. Pengukuran Aktivitas Protease (Walter, 1984)

Pereaksi	Jumlah (ml)		
	Blanko (ml)	Standar (ml)	Sampel (ml)
Bufer Tris HCl 0,2 M pH 8	1	1	1
Kasein 2%	1	1	1
Aquades	0,2	-	-
Tirosin standar (5 mmol/l)	-	0,2	-
Enzim sampel	-	-	0,2
Inkubasi pada suhu 50 C selama 10 menit			
TCA	2	2	2
Aquades	-	-	0 2
Enzim protease	0,2	0 2	-
Inkubasi pada suhu 37 C selama 10 menit dan sentrifugasi 4000 rim, 10 merit_			
Filtrat	1,5	1,5	1 5
Natrium Karbonat	5	5	5
Folin (1:2)	1	1	1
Inkubasi pada suhu 37°C selama 20 merit, Absorbansi diukur pada panjang gelombang 578 nm			

Dialisis

Dialisis dilakukan untuk menghilangkan kadar garam yang tersisa dari proses pengendapan dengan ammonium sulfat menggunakan kantong dialisis. Kantong diikat dengan benang jahit, lalu dimasukkan 10 ml larutan enzim, dan kemudian ujung lain diikat dengan benang. Kandung dimasukkan dalam larutan Tris HC120 mM dengan volume 100 kali volume filtrat dan diagitasi secara perlahan pada suhu 4°C selama 1 jam. Setelah 30 menit bufer diganti dengan bufer segar. Enzim hasil dialisis dipekatkan menjadi setengah volume dengan *freeze dryer* dan disimpan pada suhu 4°C untuk segera dilakukan kromatografi filtrasi gel.

Kromatografi Filtrasi Gel

Kolom kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100 diekuilibrisasi dengan mengalirkan bufer Tris HCL 10 M sebanyak 200 ml dan didiamkan selama semalam pada suhu 4°C. Larutan protease sebanyak 2 ml dimasukkan dengan pipet secara perlahan kedalam kolom tepat di atas permukaan gel. Enzim dibiarkan mengalir perlahan sampai seluruh enzim berada dibawah permukaan gel. Kolom diisi dengan pengelusi yaitu bufer Tris HCl 10 mM pH 8. Fraksinasi sebanyak 20 fraksi sebanyak 70 tetes pada masing-masing fraksi menggunakan *fraction collector*. Setiap fraksi diukur aktivitas protease dan kadar proteinnya.

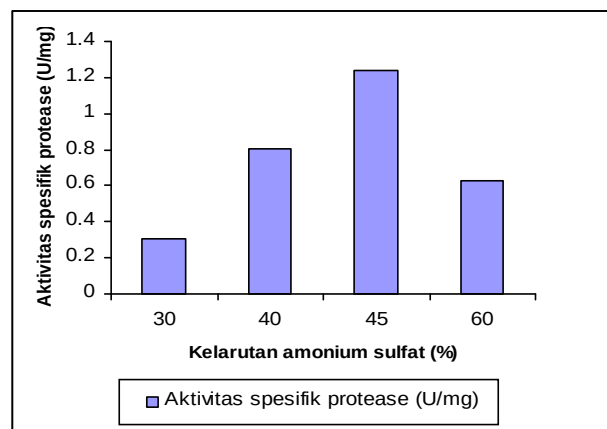
Hasil dan Pembahasan

Lactobacillus acidophilus mengekskresikan protease ekstraseluler dengan aktivitas tertinggi adalah (0,752 U/mg) masa pertumbuhan bakteri tersebut (fase logaritma pertumbuhan).

Pengendapan Ammonium sulfat dan Dialisis

Sebelum dilakukan pemurnian dengan filtrasi gel, protease terlebih dahulu dipekatkan menggunakan garam amonium sulfat. Pengendapan menggunakan garam didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam, dan daya tolak menolak protein yang beimuatan 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 mengeilingi 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 1 . Pengendapan protease *Lactobacillus acidophilus* dengan amonium sulfat.

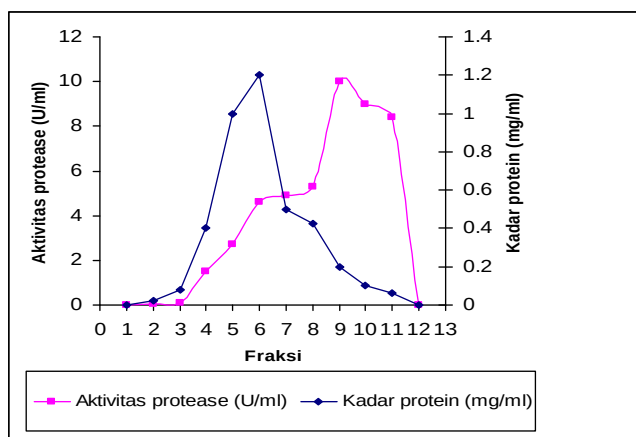
Protease *Lactobacillus acidophilus* hasil pengendapan 45% amonium sulfat menunjukan aktivitas spesifik protease yang tertinggi yaitu 1,24 U/mg, sehingga digunakan untuk pemurnian tahap selanjutnya. Pengaruh garam mineral dan kelebihan amonium sulfat dalam enzim dihilangkan dengan menggunakan metoda dialisa. Proses penghilangan garam (*desalting*) menggunakan metoda dialisa dilakukan dalam waktu yang tidak terlalu lama (kurang lebih 60 menit) untuk menghindari terjadinya penurunan aktivitas proteasenya. Hasil yang diperoleh menunjukkan aktivitas spesifik protease yaitu 1,15 U/mg.

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.

Hasil kolom Sephadex G-100 menghasilkan satu puncak protein yang melebar. Fraksi yang memiliki aktivitas protease yang tertinggi adalah fraksi ke-7 dengan aktivitas spesifik sebesar 12,5 U/mg. Pemurnian hyaluronidase SGB dengan kolom Sephadex G-100 memberikan tingkat kemurnian sampai 16,6 kali ekstrak kasar dengan perolehan 12,6%. 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



Gambar 2. Profil hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel Sephadex G-100.

Kesimpulan

Metode pemurnian yang digunakan untuk memurnikan protease ekstraseluler *Lactobacillus acidophilus* memiliki efektivitas yang rendah karena hanya menghasilkan 12,6% protein enzim dari ekstrak kasar.

Ucapan Terimakasih

Penulis ucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada semua pihak yang berperan demi terselesainya

penelitian ini, khususnya bagi Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran yang memberikan pendanaan.

Daftar Pustaka

- Bradford, MM.1976. A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilization. The principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T-4. Nature: 227:680-685
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, and Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proleases. J.Microbiol. Mol.Bio.Rev.62:597-635
- Scopes RK. 1987. Protein Purification Principles and Practice. Edisi ke-2. New York: SpringerVerlag.
- Thomas TD and Pritchard GG. 1987. Proteolytic enzymes from dairy starter cultures. Fed. Eur. Microbiol.Soc.Microbiol. Rev. 46:245
- Tsakalidou E, Dalezios I, Georgalaki M, and Kalantzopoulos G. 1993. A Comparative: Aminopeptidase Activities from *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J.Dairy Sci. 76:21452151
- Walter HE. 1984. Method with haemoglobin, casein, and azocoll as substrate In. Bergmeyer. HU (ed). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie. Deerfield Beach Florida Basel

Tabel 2. Pemurnian protease *Lactobacillus acidophilus*

Tahap Pemurnian	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Aktivitas (Unit)	Aktivitas Spesifik (Unit/mg)	Tingkat Kemurnian	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	100	40	30,1	0,752	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 45%	15	15	18,6	1,24	1,64	62
Dialisa	10	9	10,34	1,15	1,52	34
Filtrasi Gel	10	4	50	12,5	16,6	12,6