



## Isolasi dan Karakterisasi Protease Serupa Tripsin (PST) dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270

### (Isolation and Characterization Trypsin - Like Protease (PST) from *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270)

TRISMILAH<sup>1,2\*</sup>, WAHONO SUMARYONO<sup>2</sup>, AMARILA MALIK<sup>3</sup>,  
MOHAMAD SADIKIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Ilmu Biomedik, Universitas Indonesia, Salemba, Jakarta.

<sup>2</sup>Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), LAPTIAB, PUSPIPTEK, Serpong.

<sup>3</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Kampus Depok, Depok 16424.

Diterima 7 Juli 2013, Disetujui 20 Februari 2014

**Abstrak:** Tripsin adalah suatu enzim yang penting baik untuk keperluan riset maupun industri farmasi, obat dan kesehatan, terutama untuk dikembangkan sebagai bahan baku enzim pencernaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi protease serupa tripsin (PST) dari sumber yang belum banyak diteliti sebagai penghasil tripsin, yaitu *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270. Fermentasi untuk mengisolasi PST dari *L. plantarum* FNCC 0270 telah dilakukan menggunakan fermentor LKB volume kerja 3,5 liter, pada suhu 37 °C, pH 8, agitasi 77 rpm dan aerasi 0,5 vvm. Komposisi media terdiri dari 3,64% baker yeast, 1,21% glukosa, 0,13% susu skim. Dari proses fermentasi tersebut dihasilkan aktivitas enzim sebesar 0,00129 U/mL, kadar protein 0,49 mg/mL. Pemurnian PST ini dilakukan dengan ultrafiltrasi *Hollow Fiber Catridge* 5 kD, pengendapan ammonium sulfat jenuh (30-70%), membran *polyestersulfone* 30 kD dan kolom kromatografi penukar ion Q-XL dan kolom kromatografi afinitas HiTrap masing-masing memberikan peningkatan kemurnian terhadap PST kasar. Hasil analisis protein dengan SDS-PAGE PST menunjukkan adanya pita pada berat molekul setara dengan 47,35; 38,42; 21,40 dan 12,96 kD. PST hasil isolasi dapat stabil pada pH dan rentang suhu 25-35 °C, yaitu dengan waktu paruh yang tetap sama pada 693,2 menit. Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dari PST masing-masing adalah 0,231 mM dan 0,001 U/mL menggunakan substrat *N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilida*. PST dihambat oleh EDTA,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  dan oleh substrat-substrat spesifik. Hasil karakterisasi PST dari *L. plantarum* FNCC 02700 dapat disimpulkan bahwa protease serupa tripsin (PST) adalah tripsin.

**Kata kunci:** *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270, protease serupa tripsin (PST), pemurnian, karakterisasi.

**Abstract:** Trypsin is an enzyme which is important for research as well as for the pharmaceutical industry, medicine and health, which is especially developed as a raw material for digestive enzymes. This study aimed to characterize PST from *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270 that have not been studied as a producer of trypsin. Fermentation for producing PST by *L. plantarum* FNCC 0270 was performed in the LKB fermentor with working volume of 3.5 liters, at temperature of 37 °C, pH value of 8, agitation rate of 77 rpm and aeration of 0.5 vvm. The media composition were 3.64% baker's yeast, 1.21% glucose, 0.13% skim milk. The fermentation resulted in enzyme activities of 0.00129 U/mL and protein content of 0.49 mg/mL. Purification of the PST conducted by ultrafiltration *Hollow Fiber Catridge* 5 kD, presipitated with ammonium sulfate saturated (30-70%), 30 kD membrane *polyestersulfone*, ion exchange column chromatography Q-XL and HiTrap affinity column chromatography. All of system increased purity of the crude PST. SDS-PAGE of PST indicated the molecular weights of 47.35; 38.42;

\* Penulis korespondensi, Hp. 08161436792  
e-mail: trismilah\_m@yahoo.com





21.40 and 12.96 kD. The PST was stable at pH value of 8 and temperature range of 25-35 °C. It is proved that the same half-life was 693.2 minutes.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the PST were 0.231 mM and 0.001 U/mL, respectively using *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide as the substrate. PST was inhibited by EDTA,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and specific substrates. Based on the result of characterization of PST from *L. plantarum* FNCC 0270 can be concluded that the trypsin-like protease (PST) was trypsin.

**Key words:** *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270, trypsin-like protease (PST), purification, characterization.

## PENDAHULUAN

INDONESIA mengimpor hampir seluruh kebutuhan enzim (sekitar 90%) dari luar negeri. Dari aspek pasar, kebutuhan enzim di Indonesia terus meningkat sebagaimana dapat dilihat dari nilai impor. Menurut Badan Pusat Statistik, impor untuk produksi farmasetika tahun 2007 adalah sebesar 2,988 trilyun rupiah, tahun 2008 menjadi 3,391 trilyun rupiah dan pada tahun 2011 diperkirakan menjadi 4,55 trilyun rupiah<sup>(1)</sup>.

Kebutuhan enzim dunia terus meningkat yaitu sebesar 6,5% per tahun dan menjadi \$5,1 miliar pada tahun 2009<sup>(2)</sup>. Beberapa produk enzim pencernaan (protease, amilase, lipase) sudah beredar di pasar dengan berbagai merk dagang. Salah satu dari enzim pencernaan tersebut adalah protease (tripsin) yang dihasilkan dari tanaman dan hewan. Pada kasus gangguan pankreas, defisiensi tripsin seringkali terjadi karena berkurangnya ekspresi tripsin di pankreas. Pasien dengan masalah pankreas dapat ditangani dengan pemberian suplemen enzim pencernaan. Tripsin digunakan untuk mengurangi gejala alergi, juga dapat digunakan sebagai suplemen makanan (*nutraceutical*) dan menunjukkan efek anti-tumor<sup>(3,4)</sup>.

Hingga saat ini, banyak penelitian telah dilakukan untuk isolasi tripsin dari berbagai jenis ikan termasuk ikan bawal, kakap bermata besar, ikan kakap merah, chinook salmon, sarden monterey, ikan mandarin dan cakalang<sup>(5)</sup>. Tripsin juga dapat diisolasi dari daging babi dan sapi, namun dapat menimbulkan resiko penularan *bovine spongiform encephalopathy* (penyakit sapi gila). Oleh sebab itu, minat terhadap tripsin dari mikroba meningkat karena mikroorganisme dapat diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek, serta produksi dapat berjalan terus menerus. Bakteri asam laktat (BAL) adalah salah satu mikroba yang tidak berbahaya dan mendapat status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) dari FDA sehingga aman digunakan untuk produk pangan.

Manfaat lain yang diberikan BAL diantaranya adalah pada industri kimia (asam laktat, etanol, biopolimer), biologi (enzim), farmasi (probiotik). BAL juga dapat menghasilkan metabolit antimikrob seperti reutericyclin, reuterin dan reutericin yang dapat

menghambat pertumbuhan beberapa kontaminan makanan yang bersifat patogen. BAL menghasilkan berbagai macam eksopolisakarida (EPS) yaitu polisakarida yang telah banyak diaplikasikan pada industri makanan serta berpotensi dalam industri farmasi dan kesehatan<sup>(6)</sup>.

Negara Indonesia mempunyai keragaman hayati mikroba yang besar sehingga potensial untuk menjadi negara produsen enzim mikroba untuk keperluan berbagai industri. Oleh karena itu, kegiatan untuk memproduksi enzim yang memanfaatkan sumber daya lokal sangat diperlukan untuk mendorong kemandirian bangsa dalam memproduksi enzim sekaligus memberi nilai tambah pada keragaman hayati Indonesia. Namun, enzim-enzim tersebut perlu dikaji lebih lanjut karakteristiknya dalam perspektif sains dan teknologi, keekonomian maupun kehalalannya.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan protease serupa tripsin (PST) yang murni dan karakteristik PST yang dihasilkan. Fermentasi PST dari *Lactobacillus plantarum* FNCC 02700 menggunakan media yang lebih murah (glukosa, ekstrak khamir, susu skim) dari pada media pertumbuhan BAL yaitu *de Man Rogosa Sharp Broth* (MRSB), ekstrak khamir diganti dengan *baker yeast* yang harganya juga jauh lebih murah.

Pemurnian protease serupa tripsin dilakukan menggunakan kromatografi penukar ion dan kromatografi afinitas. Karakterisasi terhadap PST meliputi stabilitas, penghambatan, waktu paruh, nilai  $D^{(7)}$  serta penentuan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  menggunakan *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilida (BAPNA) sebagai substrat.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bakteri asam laktat (BAL) yang digunakan untuk memperoleh protease serupa tripsin (PST) adalah *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270 yang diisolasi dari Growol, makanan khas rakyat dari Kulon Progo, Yogyakarta, 8 koleksi Laboratorium Teknologi Bioindustri-LAPTIAB, BPPT.

Bahan lain untuk regenerasi *L. plantarum* FNCC 0270 adalah media *de Man Rogosa and Sharp Broth* (MRSB) (Oxoid CM0359), glukosa (Applichem



A1349), ekstrak khamir (Scharlau 07-079), susu skim (Oxoid L31), monosodium glutamat (MSG) (Sasa), gliserol 20% (Applichem), *peptone bacteria* (Conda).

**Alat.** *High Speed Refrigerated Centrifuge* Himac CR21G dan rotor R10A2, *Hollow Fiber Cartridge* model UFP-5-E-4MA type 5000 NMWC (5 kD), pemekatan dengan PEG 20kD (selofan 12 KD), membran polyethersulfon 30 kD, kromatografi penukar ion (kolom resin Q-XL 1mL, larutan dapar Tris-Cl 10 mM pH 8 + NaCl 1 M), kromatografi affinitas (kolom HiTrap Benzamide FF (high sub) 1mL; ligand p-aminobenzamide), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2001).

**METODE. Produksi dan Isolasi protease serupa (PST).** Peremajaan isolat dilakukan secara aseptis yaitu dengan menginokulasikan 40 µL kultur stok *Lactobacillus plantarum* FNCC 0270 ke dalam 4 mL media MRSB 5,2%, diinkubasi pada suhu 37 °C, pH 8 dan agitasi 50 rpm selama 24 jam.

Pembuatan inokulum dilakukan secara aseptis dengan menginokulasikan 2 mL dari peremajaan isolat ke dalam 30 mL media MRSB 5,2%, diinkubasi pada suhu 37 °C, pH 8 dan agitasi 50 rpm selama 18 jam.

Inokulum sebanyak 31,5 mL tersebut kemudian diinokulasikan secara aseptis ke dalam 283,5 mL media *starter* dengan komposisi 3,64% *baker yeast*, 1,21% glukosa dan 0,13% susu skim, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C, pH 8, agitasi 150 rpm selama 6 jam, selanjutnya disebut *starter*. *Starter* (*L. plantarum* FNCC 0270) dipisahkan dari cairannya menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, suhu 4 °C selama 15 menit, sebelum diinokulasikan ke dalam media produksi PST.

*Starter* yang sudah terpisah dari cairannya diinokulasikan secara aseptis ke dalam media produksi 3,5 liter dengan komposisi media 3,64% *baker yeast*, 1,21% glukosa dan 0,13% susu skim, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C, pH 8, agitasi 77 rpm dan aerasi 0,5 vvm. Pemanenan enzim dilakukan setelah fermentasi selama 24 jam. Supernatan dipisahkan dari endapannya melalui sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm menggunakan *High Speed Refrigerated Centrifuge* Himac CR21G dan rotor R10A2 selama 15 menit pada suhu 4 °C. PST kasar yang berada di supernatan selanjutnya dianalisis aktivitasnya dengan metode Khantaphant dan Benjakul, 2010<sup>(5)</sup>, kadar protein dengan metode Bradford, 1976<sup>(9)</sup> serta dihitung jumlah selnya menggunakan hemasitometer.

**Pengukuran Aktivitas PST.** Aktivitas PST diukur dengan menggunakan *N-α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilida* (BAPNA) sebagai substrat menurut metode Khantaphant dan Benjakul<sup>(5)</sup>. Aktivitas tripsin dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Aktivitas tripsin (unit/mL)} = \frac{(A-A_0) \times \text{volume campuran (mL)} \times 1000}{8800 \times \text{waktu reaksi (min)} \times 0.2}$$

Keterangan:

8800 (cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>): koefisien kepunahan ρ-nitroanilin;

A dan A<sub>0</sub>: absorbansi sampel dan blangko.

Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai pelepasan 1 nmol ρ-nitroanilin per menit.

Sampel PST 200 µl dicampur dengan 200 µl air suling dilarutkan di dalam 1000 µl dapar (50 mM dapar Tris-HCl, pH 8,0, mengandung 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Reaksi ini dimulai dengan menambahkan 200 µl dari 2 mg/mL BAPNA pada campuran reaksi. Setelah inkubasi 20 menit pada 60 °C, ditambahkan 200 µl asam asetat 30% (v/v) untuk mengakhiri reaksi. Produksi ρ-nitroanilin diukur dengan absorbansi pada panjang gelombang 410 nm (A<sub>410</sub>). Blangko dilakukan dengan cara yang sama, kecuali sampel PST yang ditambahkan setelah penambahan asam asetat 30%.

#### Pemurnian Protease Serupa Tripsin.

**Ultrafiltrasi.** Ultrafiltrasi bertujuan untuk memurnikan PST dari hasil sentrifugasi dengan cara pemekatan. Alat yang digunakan adalah *hollofiber cartridge* 5 kD. Tekanan yang diberikan sama untuk setiap perlakuan, yaitu 1 Psia. Sampel 3000 mL dijadikan 300 mL. Setiap pengambilan sampel dari hasil pemekatan, retentat dan permeat dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Selanjutnya retentat volume 300 mL dimasukkan ke dalam *Amicon stirred cell* dengan membran *polyethersulfone* 30 kD dijadikan 75 mL pada suhu 4 °C. Hasil ultrafiltrasi pada retentat diharapkan berat molekul PST di atas 30 kDa, sedangkan pada permeat di bawah 30 kDa. Setelah dipakai, membran dicuci dengan NaOH 1M dan air suling.

**Pengendapan PST dengan Ammonium Sulfat.** Penggunaan ammonium sulfat bertujuan untuk memurnikan PST dengan cara pengendapan. Pengendapan terjadi karena adanya peningkatan kekuatan ion atau *salting out*. Protease serupa tripsin ditempatkan ke dalam labu Erlenmeyer dan suhu labu dikondisikan menjadi 4 °C menggunakan balok es. Penambahan larutan ammonium sulfat 30% (b/v) jenuh dilakukan dengan pengadukan dan dituang sedikit demi sedikit ke dalam larutan PST. Volume larutan ammonium sulfat jenuh yang terbentuk dicatat. Proses pengadukan membutuhkan waktu ± 60 menit, kemudian disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam untuk menyempurnakan pengendapan. Endapan yang dihasilkan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 xg/15 menit. endapan kemudian dipisahkan dari cairannya. Cairan yang tersisa dicatat volumenya dan dilakukan presipitasi kembali dengan menggunakan prosedur yang sama tetapi dengan konsentrasi



ammonium sulfat yang lebih tinggi. Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan adalah 30%, 50%, 60% dan 70%. Tiap contoh yang dihasilkan pada tahap ini diukur unit aktivitas enzimnya.

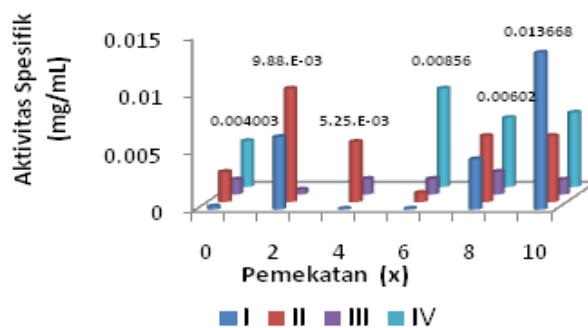
**Dialisis.** Tujuan dialisis untuk menghilangkan kadar garam (*desalting*) yang terkandung pada endapan protein hasil pengendapan oleh garam. Dialisis dilakukan menggunakan tabung selofan yang bersifat semipermeabel. Molekul besar protein tertahan dalam membran, sedangkan molekul kecil dapat lolos keluar melalui pori membran dan larut dalam pelarut yang digunakan. Dialisis dilakukan selama 30 menit dengan dua kali pergantian dapar dialisis, pada suhu 4 °C untuk menjaga stabilitas enzim. Pelarut yang digunakan adalah dapar Tris-Cl 0,05 M pH 8,0.

**Elektroforesis.** Elektroforesis dilakukan untuk memperkirakan berat molekul PST atau mengetahui kandungan protein secara kualitatif. Elektroforesis dilakukan menggunakan sodium dodesil sulfat gel poliakrilamida (SDS-PAGE) 12% pada pH 7,5. Penanda protein ini disiapkan dengan melarutkan 7,5 µL penanda protein dengan 2,5 µL dapar sampel. Penanda protein yang digunakan adalah *low molecular weight* (Amersham Pharmacia Biotech; Upsala Swedia). Elektroforesis dijalankan pada 125 volt, 100 A selama 2 jam. Gel Elektroforesis (GE) terdiri dari: dapar Tris-HCl pH 8,8 dan 6,8 masing-masing untuk *separating gel* dan *stacking gel*, SDS 10%, akril amid, APS 10%, TEMED dan air suling.

**Pewarnaan SDS-PAGE.** Gel dikeluarkan dari platnya dengan cara membuka *plate* kaca yang tipis dengan menggunakan spatula yang pipih, kemudian dialiri dengan air sampai gel terlepas dari *plate* kaca yang tebal, ditambahkan air destilasi (*mili-Q water*). Diinkubasi di *microwave* selama 1 menit, sampai 3x (per menit diganti airnya), diwarnai dengan PAGE-blue, kemudian *dishaker* selama ± 30 menit dengan kecepatan ± 50 rpm. Dibilas dengan air destilasi, lalu *shaker* selama 30 menit sampai pita-pita protein terlihat. Kalau pita belum terlihat, *shaker* kembali ± 30 menit.

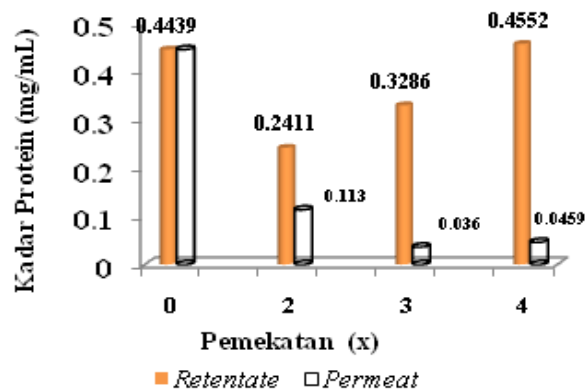
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ultrafiltrasi dengan *hollofiber* 5 kD, membran 30 kD dan pemekatan dengan PEG. Ultrafiltrasi *hollofiber cartridge* 5 kD digunakan untuk pemekatan PST hasil fermentasi (volume 3500 mL menjadi 350 mL), tekanan 1 Psia. Setiap pengambilan sampel dari hasil pemekatan (0x, 2x, 4x, 6x, 8x, 10x) retentat dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya, hasil aktivitas spesifik enzim *versus* pemekatan dapat dilihat pada Gambar 1. Aktivitas spesifik tertinggi diperoleh pada pemekatan ke-10 kali.



Gambar 1. Aktivitas spesifik PST vs pemekatan PST (x): 0x, 2x, 4x, 6x, 8x, 10x menggunakan *hollofiber cartridge* 5 kD pada fermentasi di dalam fermentor volume 3,5 L; T 37 °C; pH 8; 0,5 vvm.

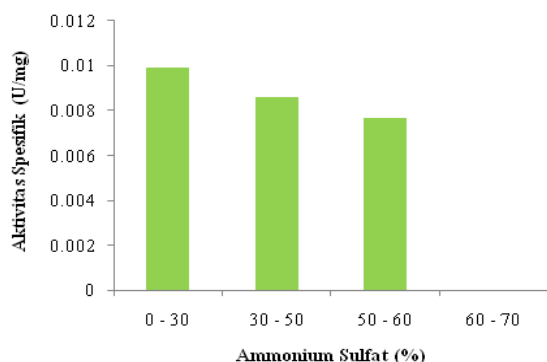
Pemekatan terhadap retentat PST dilakukan dengan membran *polyethersulfone* 30 kD di dalam *stirred cell*. Pemekatan 0 kali, 2 kali, 3 kali dan 4 kali diperoleh retentat dan permeat untuk selanjutnya dianalisis aktivitas enzim dan kadar proteinnya. Hasil dari pemekatan dapat dilihat pada Gambar 2 (kadar protein versus pemekatan). Gambar 2 tersebut menunjukkan kenaikan kadar protein pada retentat, sedangkan pada permeat menunjukkan penurunan.



Gambar 2. Kadar PST (mg/mL) vs pemekatan PST (x): 0x, 2x, 3x, 4x menggunakan membran *polyethersulfon* 30 kD.

**Pemurnian Protein dengan Pengendapan Ammonium sulfat dan Dialisis.** PST yang dihasilkan oleh *L. plantarum* FNCC 0270 setelah dipekatkan dengan ultrafiltrasi membran 30 kD memiliki aktivitas spesifik sebesar  $4,147 \times 10^{-3}$  U/mg dari permeat. Protease yang telah dipekatkan dengan ultrafiltrasi kemudian dipekatkan kembali dengan ammonium sulfat dengan tujuan mengendapkan protein. Pengendapan dilakukan secara seri yaitu 0-30%, 30-50%, 50-60%, dan 60-70% (Gambar 3). Pada konsentrasi ammonium sulfat 60-70% aktivitas enzim adalah negatif (nol). Aktivitas enzim tripsin tertinggi 0,003 U/mL diperoleh pada konsentrasi ammonium sulfat 30-50% dengan kadar protein 0,347 mg/mL.





**Gambar 3.** Aktivitas (U/mL) dan aktivitas spesifik enzim (mg/mL) vs kadar garam ammonium sulfat (0-30%, 30-50%, 50-60%, 60-70%).

Pengendapan dengan ammonium sulfat 30-50% dan dialisis mengalami kenaikan masing-masing kemurniannya 3,3 dan 4,6 kali dari enzim kasar. Hasil ini tidak jauh berbeda pada pengendapan dengan ammonium sulfat 40-60%. Pada pemurnian tripsin dari jeroan ikan serigala Atlantik (*Anarhichas lupus*) diperoleh kemurnian 5,3 kali dari enzim kasar, sedangkan pemurnian dengan ultrafiltrasi 50 kD NMW kemurniannya 38,1 kali dari enzim kasar<sup>(10)</sup>.

Pemurnian tripsin dari *Pyloric caeca* (ikan kakap merah belang coklat) dengan ammonium sulfat 40-60% menghasilkan kemurnian 8 kali dari enzim kasar, sedangkan pemurnian dengan kolom DEAE diperoleh kemurnian 20 kali dari enzim kasar<sup>(7)</sup>. Pemurnian enzim kasar PST dengan ultrafiltrasi *hollofiber* 5 kD memberikan kemurnian 2,5 kali dari enzim kasar, kemudian dilanjutkan dengan membran *polyestersulfone* (PES) 30 kD pada retentat dan permeat masing-masing kemurniannya sepertiga (1/3) dan 1,5 kali dari enzim kasar.

Pemurnian enzim xilanase menggunakan membran *polyestersulfone* (PES) 30 kD diperoleh kemurnian 6,15 untuk permeat dan 4,98 untuk retentat pada pH 7-8<sup>(11)</sup>. Pemurnian PST dari *L.*

*plantarum* FNCC 0270 dengan kolom kromatografi penukar ion Q-XL dan kromatografi afinitas, masing-masing memberikan kemurnian 6,314 dan 13,79 kali dari PST kasar. Hasil pemurnian PST tidak jauh berbeda dengan pemurnian tripsin dari ikan makarel berbintik (*Scomber australasicus*)<sup>(12)</sup> menggunakan kolom *sephacryl* S-200 dan kolom *sephadex* G-50, kemudian dipekatkan dengan liofilisasi, menghasilkan kemurnian masing-masing 1 dan 20 kali dari enzim kasar, namun *yield*-nya 84 dan 81%.

Analisis perhitungan *yield* (%) adalah aktivitas total pada pemurnian saat itu dibagi aktivitas total pada enzim kasar awal dikalikan 100. Kemurnian enzim (*fold*) adalah aktivitas spesifik total pada pemurnian saat itu dibagi aktivitas spesifik total enzim kasar awal. Data tahapan pemurnian PST dari *L. plantarum* FNCC 02700 dapat dilihat pada Tabel 1.

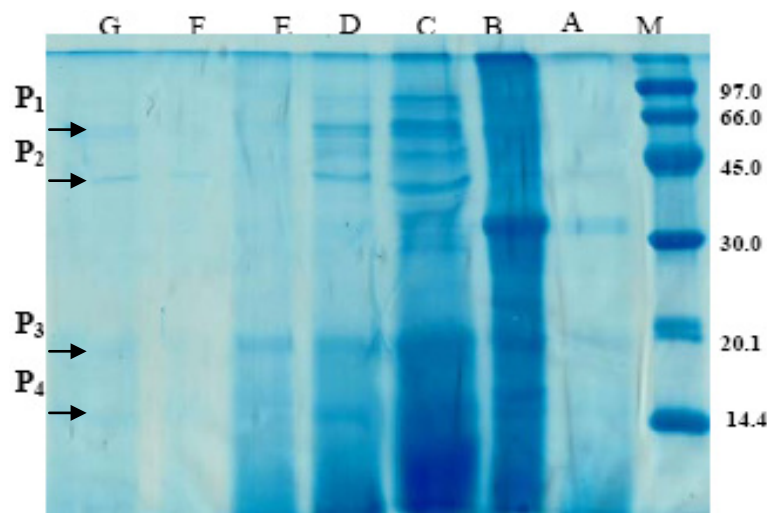
**Elektroforesis.** Elektroforesis dilakukan untuk memperkirakan berat molekul enzim, pada penelitian ini menggunakan SDS-PAGE dengan pewarnaan *coomasie brilliant blue* (CBB). Hasil elektroforesis dari beberapa tahap perlakuan terhadap protease serupa tripsin dapat dilihat pada Gambar 4. Sumur G dari kolom afinitas terpisah menjadi 4 pita untuk memperkirakan berat molekul. Hasil SDS-PAGE yang diwarnai dengan *silver staining* dapat dilihat pada Gambar 5. Dari gambar ini, terlihat bahwa kontrol tripsin dari porsin adalah pita yang setara dengan BM 23,5 kD.

**Hasil SDS-PAGE Pewarnaan CBB untuk memperkirakan BM PST.** Berdasarkan nilai Rf yang diperoleh seperti terlihat pada Gambar4, dibuat kurva standard LMW. Diperoleh persamaan kurva standard  $Y = -1,162x + 4,984$ . Kemudian, dari nilai Rf pada sumur G (hasil kolom afinitas yang dipekatkan dengan *freeze dry*) diperoleh 4 pita. Berat molekul PST dari *L. plantarum* FNCC 0270 diperkirakan setara dengan 47,35; 38,42; 21,40 dan 12,96 kD. Dari NCBI, referensi sekuens YP\_003923354.1

**Tabel 1.** Perolehan dan kemurnian PST pada setiap tahap pemurnian.

Tahapan pemurnian	Protein total (mg)	Aktivitas total (Unit)	Aktivitas spesifik (Unit/mg)	Perolehan ( <i>yield</i> ) (%)	Kemurnian ( <i>fold</i> )
Enzim kasar	1470	3,87	0,003	100	1
Ultrafiltrasi ( <i>hollow fiber cartridge</i> )	156,335	1,013	0,006	26,163	2,46
Membran PES 30kD (retentat)	58,831	0,041	0,001	1,057	0,264
Membran PES 30kD (permeat)	7,234	0,030	0,004	0,775	1,575
Pengendapan (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 30-50%	17,4	0,150	0,009	3,863	3,264
Dialisis	8,9	0,109	0,012	2,806	4,635
Kromatografi Ion	0,0308	0,0005	0,0166	0,013	6,314
Kromatografi afinitas	0,1176	0,0043	0,0363	0,110	13,792





Gambar 4. Elektroforegram SDS-PAGE PST dengan pewarnaan *coomassie blue*. M: Marka protein, A: enzim kasar, B: ultrafiltrasi (UF) 5 kD, C: UF-PEG (20 kD), D: UF-membran 30 kD (ret.), F: kolom afinitas, E: UF-membran 30 kD, (permeat), G: kolom afinitas-*freeze dry*.

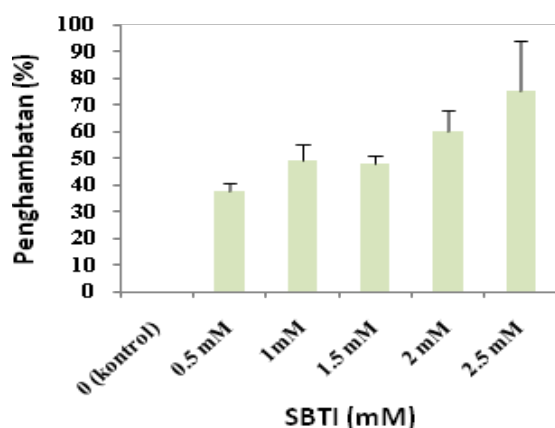


Gambar 5. Elektroforegram SDS-PAGE PST dengan *silver staining*. M: marka protein, A: tripsin porsin, B: UF 5 kD-PEG 20 kD.

untuk produk protease serine HtrA dari *L. plantarum* subsp. *plantarum* ST-III dengan metode *conceptual translation* dikalkulasi BM nya 42,97 kD.

Tripsin dari *Pyloric caeca* mempunyai satu pita yang diperkirakan BM nya 23 kD. Umumnya tripsin dari ikan dilaporkan memiliki BM antara 20-30 kD<sup>(5)</sup>. Sedangkan pada pankreas manusia ada lima bentuk tripsin yaitu, tripsinogen kationik (PRSS1), tripsinogen anionik (PRSS2), mesotripsin (PRSS3), pankreasin, tripsin IV. Pankreasin dan tripsin IV dipertanyakan<sup>(13)</sup>.

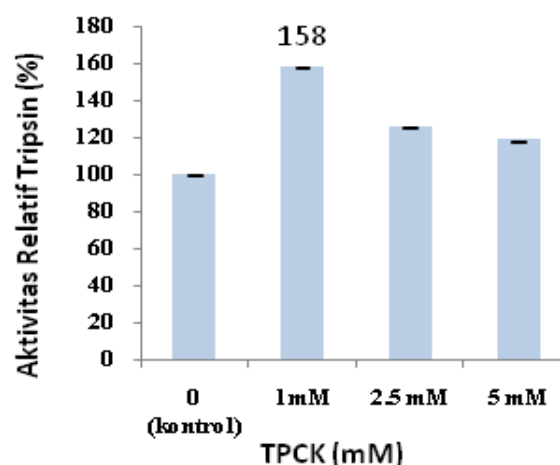
**Karakterisasi Kimia.** Hasil uji penghambatan dengan substrat spesifik *soybean trypsin inhibitor* (SBTI) menunjukkan bahwa PST dihambat oleh SBTI. Semakin besar konsentrasi SBTI, penghambatan terhadap PST semakin besar yaitu 2,5 mM. SBTI menghambat aktivitas enzim PST 75% (Gambar 6) pada suhu 37 °C, pH 8 dan waktu inkubasi 15 menit. Dengan waktu inkubasi yang sama, tripsin dari



Gambar 6. Penghambatan (%) PST oleh *soybean trypsin inhibitor* (SBTI) (waktu inkubasi 15 menit, pH 8, suhu 37 °C).

*Pyloric caeca* 99,6 % dihambat oleh 1 g/L SBTI pada pH 8,5 dan suhu 60 °C<sup>(5)</sup>.

PST memiliki kemampuan menghidrolisis substrat, maka untuk mengetahui pengaruh penghambatan oleh substrat spesifik dilakukan dengan menambahkan substrat spesifik untuk protease kimotripsin, yaitu *N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone* (TPCK). TPCK menaikkan aktivitas PST, dengan nilai aktivitas relatif enzim 158 % (Gambar 7), namun penambahan TPCK 2,5 mM dan 5 mM tidak jauh berbeda dengan kontrol, sehingga disimpulkan bahwa PST bukan kimotripsin.



Gambar 7. Aktivitas relatif tripsin (%) terhadap *N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone* (TPCK) (waktu inkubasi 15 menit, pH 8, suhu 37 °C).

Senyawa organofosfat diazinon menghambat aktivitas PST. Semakin tinggi konsentrasi diazinon yang diberikan, persentase penghambatan bertambah (Gambar 8). Organofosfat dikenal sebagai racun



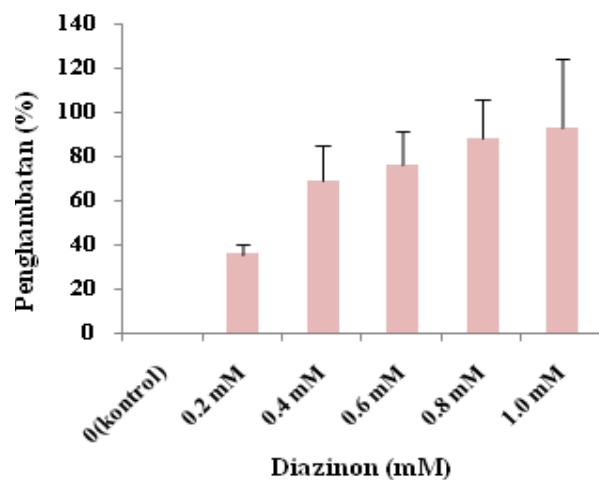
saraf (neurotoksikan) yang aktif, bahkan tidak memerlukan konversi apapun untuk dapat secara efektif menghambat enzim asetilkolinesterase. Atom P pada organofosfat akan berikatan dengan atom O gugus serin melalui reaksi fosforilasi membentuk ikatan kovalen sehingga fungsi enzim

menjadi terganggu. Dengan mengonsumsi ikan yang terpapar organofosfat, manusia secara tidak langsung mendapatkan residu senyawa ini melalui rantai makanan<sup>(14)</sup>.

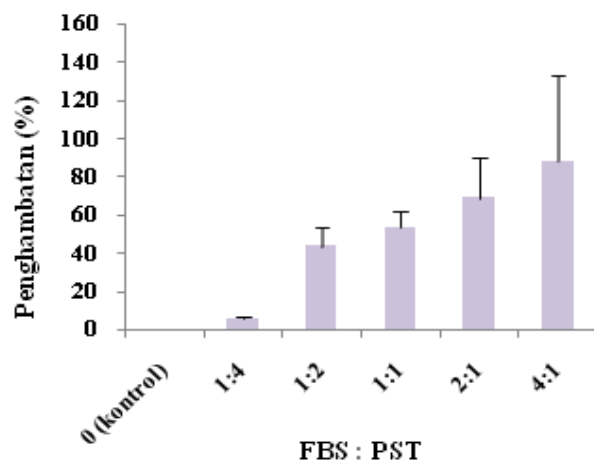
Penghambatan oleh alfa 1-anti tripsin dengan *fetal bovine serum* (FBS) terhadap PST mengalami kenaikan dengan bertambahnya konsentrasi FBS yang diberikan seperti terlihat pada Gambar 9. Nilai penghambatan 90% pada perbandingan 4:1 (FBS: PST). Hasil uji penghambatan EDTA dan logam-logam  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  dapat dilihat pada Gambar 10. EDTA dan logam-logam yang diujikan semuanya menghambat aktivitas enzim PST dan  $\text{CaCl}_2$  memberikan hambatan paling kecil terhadap aktivitas enzim EDTA nilai penghambatannya 90-100% terhadap PST untuk konsentrasi 5-10 mM pada suhu 37 °C, pH 8 waktu inkubasi 15 menit. Dengan waktu inkubasi dan substrat yang sama pada suhu 60 °C dan pH 8,5 tripsin dari *Pyloric caeca* ikan kakap merah belang coklat penghambatan 1,4% oleh 2mM EDTA<sup>(5)</sup>.

Penghambatan ion logam terhadap aktivitas protease pada konsentrasi tertentu berkaitan dengan kekuatan ion, dimana kekuatan ion itu sendiri mempengaruhi konformasi atau struktur tiga dimensi dari protein enzim atau protein substrat<sup>(15)</sup>.

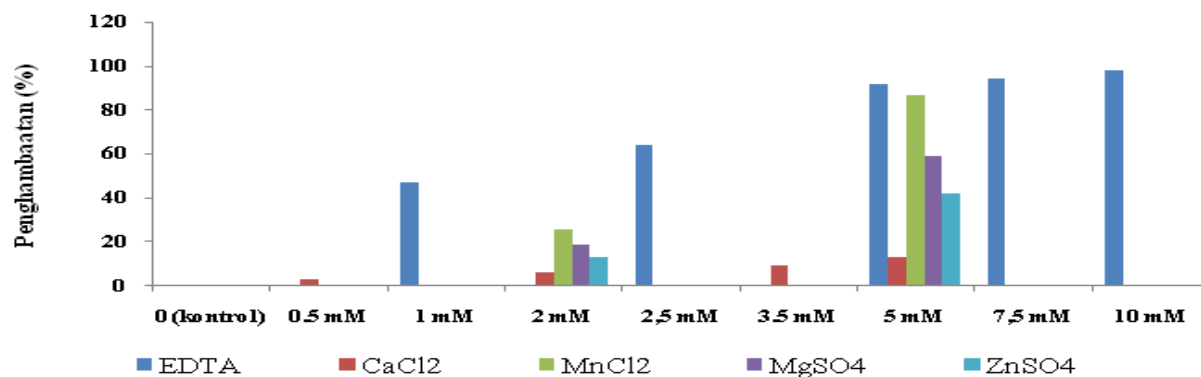
**Karakterisasi Fisika.** Uji termostabilitas dilakukan untuk mengetahui sejauh mana aktivitas enzim tetap stabil pada pemanasan. Enzim merupakan protein yang mudah mengalami kerusakan akibat denaturasi termal. Denaturasi menyebabkan susunan tiga dimensi dari rantai polipeptida protein terganggu. Molekul tersebut terbuka menjadi struktur acak, sehingga kehilangan aktivitas biologinya, tanpa menyebabkan kerusakan pada kerangka kovalen<sup>(16)</sup>. Penentuan daya tahan enzim terhadap panas pada umumnya dilakukan pada suhu optimum enzim tersebut. Penurunan aktivitas enzim akibat penambahan waktu pemanasan merupakan akibat dari perubahan konformasi sisi aktif dari enzim.



Gambar 8. Penghambatan (%) PST oleh diazinon (organo-fosfat) (waktu inkubasi 15 menit, pH 8, suhu 37 °C).



Gambar 9. Penghambatan (%) PST oleh fetal bovin serum (FBS) (waktu inkubasi 15 menit, pH 8, suhu 37 °C).



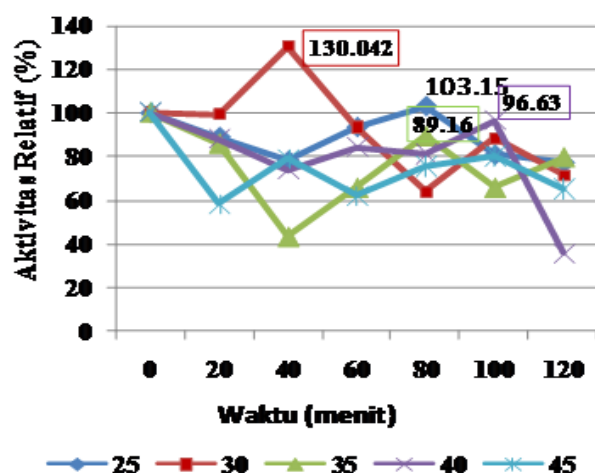
Gambar 10. Penghambatan (%) PST oleh EDTA,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  dan  $\text{ZnSO}_4$  (waktu inkubasi 15 menit, pH 8, suhu 37 °C).



Molekul enzim memiliki struktur yang lembut dan mudah rusak. Jika molekul enzim menyerap energi terlalu besar akibat naiknya suhu dan dengan bertambahnya waktu inkubasi, jumlah panas yang diterima enzim bertambah sehingga struktur tersier enzim mungkin mengalami perubahan. Akibat dari perubahan pada struktur tersier ini, sisi aktif dari enzim kemungkinan tidak dapat berfungsi sebagai mana mestinya, sehingga sulit untuk mengikat substrat. Apabila lama pemanasan diperpanjang, kestabilan enzim akan menurun yang berakibat meningkatnya laju inaktivasi<sup>(17)</sup>. Proses inaktivasi enzim pada suhu yang tinggi dapat dijelaskan terjadi 2 tahap yaitu adanya pembukaan parsial (*partial unfolding*) struktur sekunder, tersier dan atau kuarterner molekul enzim serta perubahan struktur primer enzim karena adanya kerusakan asam-asam amino tertentu oleh panas.

Pada Gambar 11, PST pada suhu 30 °C waktu inkubasi 40 menit memberikan aktivitas relatif tertinggi. Untuk semua suhu yang dicobakan menunjukkan pola menurun dengan bertambahnya waktu. Enzim stabil pada rentang suhu 25-35 °C. Hal tersebut dibuktikan waktu paruh enzim yang sama pada suhu 25, 30 dan 35 °C, yaitu 693,2 menit untuk menurunkan aktivitas enzim menjadi 50% nya. Kestabilan suhu PST lebih rendah dari pada tripsin dari *Pyloric caeca*/ikan kakap merah belang coklat. Tripsin dari ikan ini cukup stabil pada suhu 55 °C dengan sisa aktivitas 95-99% yang dianalisis pada suhu 60 °C dan pH 8,5<sup>(5)</sup>. Tabel 2 menunjukkan nilai D pada suhu 35 °C membutuhkan waktu paling lama yaitu 1205,6 menit untuk menjadikan aktivitas enzim menjadi 1/10 nya<sup>(7)</sup>.

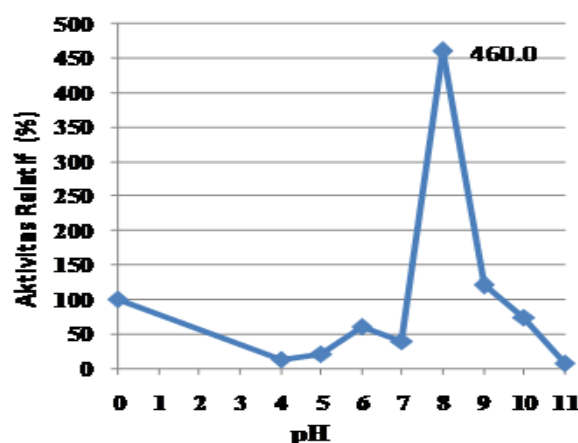
PST yang di inkubasi 30 menit, pH 8 memberikan aktivitas relatif yang tertinggi (Gambar 12) dan pada pH 11 aktivitas mendekati nol dengan uji aktivitas



Gambar 11. Aktivitas relatif (%) vs waktu PST, inkubasi enzim pada suhu 25, 30, 35 dan 45 °C, pengujian aktivitas setiap 20 menit selama 2 jam pada pH dan suhu optimumnya (pH 8 dan T 37 °C).

Tabel 2. Nilai D dan waktu paruh PST pada pH dan suhu optimumnya.

Suhu (°C)	D	t <sub>1/2</sub> (menit)
25	1083,79	693,1472
30	807,047	693,1472
35	1205,616	693,1472
40	267,404	346,5736
45	649,818	231,0491



Gambar 12. Aktivitas relatif (%) vs pH PST pada 4-5 (dapar asetat), 6-8 (dapar Tris-Cl) 9-11 (dapar glisin-NaOH), suhu 37 °C inkubasi 30 menit; uji aktivitas enzim pada pH dan suhu optimumnya (pH 8 dan T 37 °C).

enzim pada pH dan suhu optimumnya. Kestabilan pH PST lebih rendah dari pada tripsin dari *Pyloric caeca*. Tripsin dari ikan ini cukup stabil pada pH 7-10 yang dianalisis pada suhu 60 °C dan pH 8,5<sup>(5)</sup>.

Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitasnya maksimal. Nilai pH optimum enzim tidak selalu sama dengan pH lingkungan normalnya, yaitu bisa sedikit berada diatas atau dibawah pH lingkungan normalnya. Perubahan pH akan mempengaruhi kecepatan reaksi enzim, karena berubahnya derajat ionisasi gugus asam dan basa dari enzim. Untuk kebanyakan enzim, terdapat rentang pH optimum dimana aktivitas enzim berlangsung secara optimum dan mempunyai stabilitas yang tinggi.

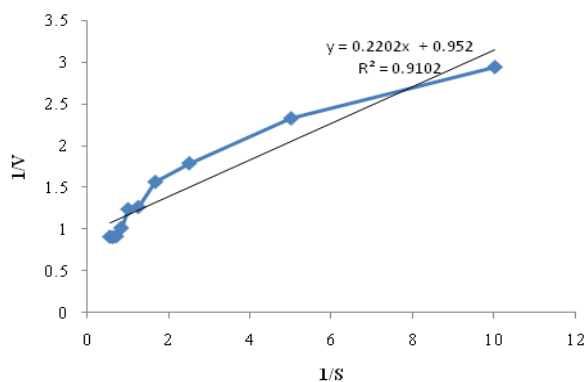
Nilai Km suatu enzim merupakan parameter yang dapat digunakan untuk menggambarkan laju maksimum (Vmaks) reaksi enzimatik. Harga Km bersifat khas untuk enzim tertentu, dengan substrat spesifik pada pH dan suhu tertentu. Nilai Km dari suatu enzim tergantung pada jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu, pH dan kekuatan ion<sup>(17)</sup>. Nilai Km yang besar berarti ikatan kompleks enzim-substrat (ES) lemah, sedangkan bila Km kecil berarti ikatan ES kuat. Nilai Km yang tinggi menunjukkan afinitas terhadap substrat rendah, demikian pula





sebaliknya. Pada umumnya, ekstrak kasar enzim akan memberikan nilai  $K_m$  yang tinggi. Hal ini dapat disebabkan oleh masih adanya kontaminan enzim lain yang juga memiliki afinitas terhadap substrat. Semakin tinggi harga  $K_m$  maka konsentrasi yang dibutuhkan untuk mencapai setengah laju reaksi maksimumnya juga semakin tinggi. Laju maksimum ( $V_{maks}$ ) akan tercapai bila semua molekul enzim telah berinteraksi dengan substrat, atau enzim telah jenuh dengan substrat, sehingga peningkatan konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan laju reaksi.

Kinetika enzim PST dari *L. plantarum* FNCC 0270 dengan substrat BAPNA ditunjukkan pada Gambar 13 dengan persamaan  $Y = 0,220 X + 0,952$ . Hasil perhitungan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  diperoleh nilai  $K_m = 0,23$  mM dan nilai  $V_{maks} = 0,0011$  U/mL, yang berarti pelepasan 0,0011 nMol p-nitroanilin/menit/mL. Nilai  $K_m$  tripsin dari *Pyloric caeca* dengan substrat BAPNA adalah 0,507 mM dan efisiensi katalitiknya 9,27 kcat/Km ( $s^{-1} mM^{-1}$ ) pada suhu 30 °C<sup>(5)</sup>.



Gambar 13. Substrat (S) vs kecepatan (V) kinetika PST terhadap substrat BAPNA pada suhu 37 °C dan pH 8.

### SIMPULAN

Protease serupa tripsin (PST) dari *L. plantarum* FNCC 0270 dihambat oleh SBTI, EDTA dan logam-logam  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  dan sedikit dihambat  $Ca^{2+}$ . Penghambatan juga dilakukan oleh senyawa organofosfat (diazinon) dan alfa 1-anti tripsin dari *Fetal Bovine Serum*. Nilai  $K_m$  0,23 mM,  $V_{maks}$  0.0011 U/mL dan waktu paruh enzim pada suhu 25 °C, 30 °C dan 35 °C, yaitu 693,2 menit untuk menurunkan aktivitas enzim menjadi 50% nya. Nilai D pada suhu 35 °C membutuhkan waktu paling lama yaitu 1205,6 menit untuk menjadikan aktivitas enzim menjadi 1/10 nya. PST stabil pada suhu 30 °C waktu inkubasi 40 menit dan pH 8 waktu inkubasi 30 menit. PST dari *L. plantarum* FNCC 0270 adalah

bukan kimotripsin karena substrat spesifik kimotripsin TPCK tidak menghambat PST. Hasil SDS-PAGE dari pemurnian PST dengan kolom afinitas (spesifik untuk tripsin) diperoleh empat pita dengan berat molekul setara 47,35; 38,42; 21,40 dan 12,96 kD.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kementerian RISTEK (Program Pasca Sarjana Tahun 2009, Nomor 105/M/KP/VIII/2009), BPPT, yang telah menyediakan dana penelitian ini hingga selesai. Serta semua pihak yang telah berpartisipasi di dalam penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Pusat Statistik. Buletin Statistik Perdagangan Luar Negeri, Import, 2008. ISSN: 0216.3668, CV. Litama Printing. 9.
2. Anonim. Related topics: Financial & industry, cultures, enzymes, yeast. Diambil dari [www.foodnavigator.com/Financial-Industry/World-enzyme-demand-to-hit-5.1bn-by-2009-68k](http://www.foodnavigator.com/Financial-Industry/World-enzyme-demand-to-hit-5.1bn-by-2009-68k), diakses 19 Mei 2009.
3. McCann M. Pancreatic enzyme supplement for treatment of multiple food allergies. *Ann Allergy*. 1993. 71: 69.
4. Ambrus JL, Lassman HB, DeMarchi JJ. Absorption of exogenous and endogenous proteolytic enzymes. *Clin Pharmacol Ther*. 1967. 8: 362-8.
5. Khantaphan S, Benjakul S. Purification and characterization of trypsin from the *Pyloric caeca* of brownstripe red snapper (*Lutjanus vita*). *Food Chemistry*. 2010. 120: 658-64.
6. Malik A, Hermawati AK, Hestiningtyas M, Soemiati A, Radji M. Isolasi dan skrining molekuler bakteri asam laktat pembawa gen glukansukrase dari makanan dan minuman mengandung gula. *Makara (Sains)*. 2012. 14: 57-62.
7. Wahyuntari B. Pemurnian dan karakterisasi protease ekstraseluler isolat prokariot termofilik ekstrim dari Tangkuban Perahu [disertasi]. Bogor: Jurusan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor; 2001. 54.
8. Ignatius Sawabi. Makanan rakyat cegah kegemukan. Diambil dari <http://travel.kompas.com/read/2010/08/16/11570266/Growol>, diakses tanggal 11 Maret 2011.
9. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bind. *Anal. Biochem*. 1976. 72: 248-54.
10. Desrosiers V, Le François NR, Blier PU. Trypsin-like enzyme from Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) viscera: Purification and characterization. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2008. 17(1).
11. Trismillah, Lutfi A. Membran polyethersulfone dan regenerated cellulose untuk ultrafiltrasi: Pengaruh pH terhadap proses ultrafiltrasi xilanase. *Jurnal Sains Dan*





66 TRISMILAH *ET AL.*

*Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*

- Teknologi Indonesia. 2009.11(2): 76-83.
12. Kishimura H, Tokuda Y, Klomklao S, Benjakul S, Ando S. Enzymatic characteristics of trypsin from *Pyloric caeca* of spotted mackerel (*Scomber australisicus*). *Journal of Food Biochemistry*. 2006. 30:466–77.
  13. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. Springer Science. 2006. 52:1-17.
  14. Setyawati I, Wiratmini NI, Wiryatno J. Pertumbuhan, hispatologi ovarium dan fekunditas ikan nila merah (*Oreochromis niloticus*) setelah paparan pestisida organofosfat. *Jurnal Biologi*. 2011. XV(2): 44-8.
  15. Baehaki A, Suhartono MT, Palupi NS, Nurhayati T. Purifikasi dan karakterisasi protease dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 2008. XIX(1).
  16. Lehninger AL. Dasar-dasar biokimia. Terjemahan Thenawijaya M. Jilid 1. Jakarta: Penerbit Erlangga; 1982.
  17. Winarno FG. Enzim pangan. Jakarta: Penerbit Gramedia; 1988.

