

Peptida Bioaktif Kasein Susu Kambing sebagai Agen Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Casein Goat's Milk Bioactive Peptides as Antibacterial Agent Against *Staphylococcus aureus*

Diana Lestari^{1a}, Eddyson Giordan¹

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jl. Raya BSD City, Cisauk Selatan, Tangerang, Banten, 15345

^aKorespondensi: Diana Lestari, E-mail: diana.lestari@atmajaya.ac.id

(Diterima oleh Dewan Redaksi : 27 - 09 - 2019)

(Dipublikasikan oleh Dewan Redaksi : 08 - 04 - 2020)

ABSTRACT

Goat milk is widely consumed as a functional food. Milk's bioactive peptides are specific peptides from milk protein degradation that possesses positive biological properties such as antihypertensive, antioxidant, antibacterial, antiinflammatory, etc. The purpose of this research is to explore the antibacterial activity of fractionated bioactive peptides derived from the hydrolysis of goat milk casein and identify the peptide profiles using SDS-PAGE electrophoresis. Casein was isolated from fresh goat milk and then hydrolyzed by crude bromelain enzyme with an activity of 0.430 U/mL for 0, 1, 2, and 3 minutes at a temperature of 50°C. Protein concentration in casein isolates was 2.234 mg/mL, whereas protein concentrations in casein hydrolyzates decreased to 1.043 to 1.096 mg/ml. Profile analysis from bromelain hydrolyzates showed some protein bands with molecular weights from about 6.6 kDa to 7.3 kDa on SDS PAGE gel. The fractionation process was carried out on selected bromelain hydrolyzates using a 30 kDa and 10 kDa membrane Cut-Off. The antibacterial test results showed that the hydrolyzates from B0 and B1 peptides showed inhibitory activity on *Staphylococcus aureus*. The fractionation process increased the antibacterial activity of hydrolyzates from peptides B0 and B1. Small molecular weight peptides have better inhibitory activity.

Keywords: antibacterial, bioactive peptide, casein, fractionation, *Staphylococcus aureus*

ABSTRAK

Susu kambing mulai banyak dikonsumsi sebagai pangan fungsional. Peptida bioaktif susu merupakan fragmen protein spesifik yang dihasilkan dari pemecahan protein susu dan akan menghasilkan peptida dengan fungsi biologis positif seperti antihipertensi, antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dll. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi aktivitas antibakteri dari peptida hasil fraksinasi dan hasil hidrolisis kasein susu kambing serta menganalisis profil protein serta peptida dengan metode SDS-PAGE. Kasein dihidrolisis oleh enzim bromelin kasar dengan aktivitas sebesar 0.430 U/mL selama 0, 1, 2, dan 3 menit dengan suhu 50 °C. Konsentrasi protein pada isolat kasein sebesar 2,234 mg/mL, sedangkan konsentrasi protein hidrolisat kasein turun menjadi 1,043-1,096 mg/ml. Proses hidrolisis akan menghasilkan hidrolisat kasein dengan konsentrasi protein yang berbeda-beda yang secara umum lebih kecil dibandingkan sebelum dihidrolisis Analisis profil peptida hidrolisat bromelin pada gel SDS-PAGE menunjukkan fragmen protein dengan berat molekul 6,6 kDa -7,3 kDa. Proses fraksinasi dilakukan pada hidrolisat bromelin terpilih dengan menggunakan membran *Cut-Off* 30 kDa dan 10 kDa. Seluruh peptida hidrolisat bromelin beserta kasein menunjukkan aktivitas penghambatan pada *Staphylococcus aureus*. Proses fraksinasi yang dilakukan meningkatkan aktivitas antibakteri peptida hidrolisat B0 dan B1. Peptida dengan berat molekul kecil memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik.

Kata kunci: antibakteri, kasein, peptida bioaktif, fraksinasi, *Staphylococcus aureus*

Lestari, Diana, Giordan E. 2020. Peptida Bioaktif Kasein Susu Kambing sebagai Agen Antibakteri. *Jurnal Agroindustri Halal* 6(1): 28 - 38.

PENDAHULUAN

Susu sudah sejak lama dikonsumsi oleh masyarakat karena kandungan gizinya yang tinggi dan memberikan dampak positif bagi kesehatan. Susu kambing banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia dalam bentuk susu kambing segar. Kandungan gizi susu terdiri dari protein, lemak, karbohidrat, mineral, dan vitamin. Kadar protein susu kambing (12,2%) sebenarnya mendekati dengan susu sapi (12,3%), sehingga susu kambing dapat menjadi alternatif bagi konsumen yang intoleran terhadap susu sapi. Protein susu sendiri terdiri dari 80% kasein dan 20% *whey*. Kasein pada susu kambing mengandung α -kasein, β -kasein, dan κ -kasein (Mohanty *et al.* 2015; Setyawardani 2017).

Protein susu kambing terdiri dari kasein dan protein *whey* yang lebih lanjut terdiri dari imunoglobulin, laktoferin, dan berbagai fraksi peptida. Peptida bioaktif adalah fraksi peptida yang mempunyai aktivitas biologis dan memberikan efek positif terhadap fungsi tubuh yang akan mempengaruhi kesehatan tubuh secara keseluruhan.

Protein atau peptida akan menjadi senyawa yang bioaktif apabila telah melewati proses hidrolisis, dimana proses tersebut dapat memutuskan ikatan peptida yang terdapat pada protein. Pada sisi pemotongan yang tepat, proses hidrolisis dapat mengaktifkan sifat bioaktif yang disebabkan oleh interaksi rantai samping dari asam amino. Jenis dan urutan asam amino yang berbeda dapat menghasilkan interaksi yang berbeda sehingga sifat bioaktif yang dihasilkan juga beragam. Proses hidrolisis dan peptida yang dihasilkan selama proses pencernaan susu sangat tergantung oleh enzim-enzim pencernaan (Padaga dan Aulanniam 2017). Selain menggunakan enzim pencernaan, proses hidrolisis enzimatis salah satunya dapat dilakukan menggunakan enzim proteolitik seperti bromelin yang banyak terdapat pada buah nanas maupun menggunakan bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik.

Konsentrasi protein susu yang tinggi menjadikan susu berpotensi untuk

menghasilkan peptida bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Salah satu aktivitas biologis yang dimiliki oleh peptida bioaktif pada susu adalah sifat antimikrob. Peptida antimikrob adalah fragmen protein berukuran kecil yang dapat membunuh atau mengganggu pertumbuhan bakteri (Marcos dan Manzanares 2013).

Peptida antimikrob dinilai semakin menarik untuk menggantikan fungsi antibiotika karena penggunaannya lebih aman. Peptida antimikrob mempunyai mekanisme penghambatan yang berbeda dengan antibiotika pada umumnya. Dalam beberapa tahun terakhir, yang menjadi perhatian terkait antibiotika adalah antibiotik yang dikembangkan belum mampu untuk mencegah kecepatan resistensi bakteri. Penggunaan peptida antimikrob diharapkan dapat menjadi alternatif pengganti antibiotika karena berasal dari protein sehingga aman dikonsumsi.

Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan potensi antimikrob pada peptida bioaktif kasein susu kambing yang dihidrolisis oleh bromelin (Rosyani 2018). Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi peptida bioaktif untuk menyeleksi peptida yang mempunyai sifat antimikrob. Salah satu metode fraksinasi untuk memurnikan sifat peptida bioaktif adalah dengan pemisahan membran berdasarkan berat molekul atau *Molecular Weight Cut Off (MWCO)*. Metode fraksinasi ini dapat meningkatkan konsentrasi peptida yang diinginkan berdasarkan ukuran berat molekul (Kusumaningtyas *et al.* 2015a). Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi aktivitas antibakteri dari peptida hasil fraksinasi dan hasil hidrolisis kasein susu kambing menggunakan bromelin serta menganalisis profil protein serta peptida dengan metode SDS-PAGE.

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan antara lain susu kambing segar peranakan Ettawa, buah nanas Subang, marker berat molekul kecil (PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder), media pertumbuhan bakteri

Tryptic Soy Broth (TSB) dan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kultur bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Metode penelitian ini dibagi menjadi delapan tahapan besar yaitu isolasi enzim bromelin kasar, isolasi kasein susu kambing, produksi peptida susu kambing, pengukuran kadar protein hasil hidrolisis, pengukuran aktivitas enzim bromelin kasar, fraksinasi peptida dengan membran filter, analisis profil peptida dengan SDS-PAGE, analisis aktivitas antibakteri, dan analisis statistik.

Isolasi Enzim Bromelin Kasar

Buah nanas Subang dibersihkan dan dipotong-potong, kemudian dicampurkan dengan menggunakan akuades steril dengan perbandingan nanas dan akuades 1:1 (w/w). Campuran dihancurkan dan diratakan menggunakan blender, dan disaring dua kali menggunakan kain saring dan kertas saring. Ekstrak nanas yang diperoleh selanjutnya disentrifugasi 14.000 rpm, 15 menit, pada suhu 4°C untuk menghilangkan pengotor. Lalu, supernatan dipisahkan sebagai ekstrak enzim bromelin dan disimpan pada suhu -20°C untuk proses produksi peptida.

Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin Kasar

Analisis dilakukan mengikuti metode Anson (1938). Pertama, 800 µL kasein (0,65% b/v dalam buffer fosfat 0,05 M, pH 7) dicampurkan dengan 200 µL ekstrak bromelin yang merupakan sampel, sebagai blanko digunakan akuades. Campuran diinkubasi dalam suhu 37°C, 10 menit. Selanjutnya kedua larutan tersebut ditambahkan 500 µL TCA dingin untuk menghentikan reaksi. Ke dalam blanko selanjutnya ditambahkan 200 µL sampel enzim dan ke dalam sampel ditambahkan 200 µL akuades.

Inkubasi dilakukan selama 30 menit, pada suhu ruang dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 13.000 rpm. 400 µL masing-masing supernatan diambil dan ditambahkan 1 mL Na₂CO₃ 0,4 M dan 200 µL Pereaksi Folin-Ciocalteu. Kemudian keduanya diinkubasi

pada suhu 37°C, 30 menit. Selanjutnya keduanya disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm, 10 menit. Selanjutnya supernatan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. Kurva standar dibuat menggunakan larutan tirosin.

Aktivitas enzim dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$UA = \frac{[tirosin]}{V_{enzim}} \times \frac{1}{P} \times \frac{1}{T} \quad (1)$$

$$AS = UA / ([Protein]) \quad (2)$$

Keterangan:

- UA = banyaknya tirosin yang terbentuk / mL enzim / menit dalam kondisi pengukuran tertentu (U/mL)
- [tirosin] = konsentrasi tirosin (µmol);
- V enzim = volume enzim yang dipakai (mL);
- P = faktor pengenceran (volume supernatan yang diambil/total volume reaksi);
- T = waktu inkubasi (10 menit);
- [protein] = konsentrasi protein enzim yang digunakan (mg/mL);
- AS = aktivitas enzim spesifik (U/mg).

Isolasi Kasein Susu Kambing

Isolasi kasein susu kambing mengacu Lestari dan Soesilo (2017). Susu segar yang diperoleh dibuang lemaknya menggunakan sentrifugasi 2000g, 4°C, 30 menit. Lemak yang membeku dibagian atas tabung dibuang. Kemudian kasein diendapkan dengan penambahan HCl pada susu yg telah dibuang lemaknya hingga mencapai pH 4,2. Endapan kasein yang diperoleh dicuci akuades sebanyak 3 kali dan diendapkan kembali dengan sentrifugasi dengan kecepatan 7.100 g selama 5 menit. Hasil isolat kasein disimpan pada suhu -4°C untuk proses analisis lebih lanjut.

Produksi Peptida Susu Kambing

Isolat kasein yang diperoleh dilarutkan dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7 dengan konsentrasi 15% (b/v). Kondisi hidrolisis kasein dijalankan menggunakan suhu 50°C,

pH 7, dengan perbandingan substrat:ekstrak bromelin 20:1 (v/v). Hidrolisis dilakukan selama 0, 1, 2, dan 3 menit.

Penghentian kondisi hidrolisis dilakukan dengan dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Sebagai kontrol digunakan kasein yang tidak dihidrolisis. Hasil hidrolisis kasein (peptida kasein) disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 g selama 5 menit dengan suhu 4°C. Kemudian disterilisasi selama 15 menit pada 105°C sebelum dilakukan uji antibakteri.

Pengukuran Kadar Protein Hasil Hidrolisis

Pengukuran kadar protein sampel dilakukan dengan metode Bradford (1976). Sebanyak 0,4 mL sampel protein direaksikan dengan 8 mL reagen Bradford. Larutan dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 596 nm. Kurva standar protein dilakukan menggunakan *Bovine serum albumin* (BSA).

Fraksinasi Peptida dengan Membran Filter

Fraksinasi peptida dilakukan dengan menggunakan prinsip *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) menggunakan membran *Cut Off* 10 kDa (Amicon Ultra centrifugal units, Merks Millipore Ltd., Darmstadt, Germany) dan membran *Cut Off* 30 kDa (Vivaspin 6 centrifugal concentrator, Sartorius AG).

Penyaringan dilakukan secara bertahap dengan menggunakan membran *Cut off* 30 kDa kemudian diikuti oleh membran *Cut Off* 10 kDa. Hasil akhirnya akan berupa 3 fraksi peptida yaitu peptida berukuran <10 kDa, peptida berukuran 10-30 kDa, dan peptida yang berukuran >30 kDa yang akan diuji aktivitas antimikrobnya (Kusumaningtyas *et al.* 2015a).

Analisis Profil Peptida dengan SDS-PAGE

Sampel terlebih dahulu dilarutkan dalam SDS 5% dengan perbandingan sampel dan larutan SDS = 1:5. Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 85°C, 1 jam dalam *waterbath shaker*. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi 2.000 g, 5 menit. Supernatan dicampurkan dengan buffer

sampel (6% Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50% gliserol, 20% SDS, 5% β-merkaptotanol, 1% *bromophenol blue*) dengan perbandingan supernatan:buffer sampel = 1:1.

Campuran kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Konsentrasi gel pemisah adalah 18% dan gel penahan adalah 6%. Jumlah sampel yang dimasukkan dalam masing-masing sumur gel adalah sebanyak 5 µL untuk isolat kasein dan sebanyak 10 µL untuk hidrolisat peptida. Marker LMW digunakan sebagai standar berat molekul. Elektroforesis dijalankan selama 4 jam pada tegangan 70Volt. Pewarnaan gel dilakukan Coomasie Brilliant Blue R-250. (Singh *et al.* 2011).

Analisis Aktivitas Antibakteri

Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasi dalam media TSB (*tryptic soy broth*) dan ditumbuhkan selama *overnight*, suhu 37°C. Suspensi bakteri diencerkan hingga diperoleh konsentrasinya setara 10⁵ CFU/mL untuk pengujian aktivitas peptida sebelum fraksinasi dan 10⁴ CFU/mL untuk pengujian aktivitas setelah fraksinasi. Suspensi bakteri dicampurkan dengan larutan sampel peptida yang ingin diuji aktivitasnya dengan perbandingan 1:2 (bakteri:peptida).

Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dalam *waterbath shaker*. Selanjutnya masing-masing campuran dilakukan *total plate count* dalam media MHA (*Mueller Hinton Agar*) *overnight* pada suhu 37°C. Sebagai kontrol negatif digunakan suspensi bakteri dan garam fisiologis dengan perbandingan yang sama (Kusumaningtyas *et al.* 2015b).

Analisis Statistik

Data pengujian yang diperoleh dari hasil pengulangan sebanyak 2 kali kemudian dianalisis menggunakan ANOVA, dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf nyata 5%. Pengujian statistik dijalankan dengan menggunakan software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Bromelin Kasar

Enzim Bromelin kasar yang diisolasi dari buah nanas subang mempunyai aktivitas pemecahan substrat sebesar 0,43 U/mL. Ekstrak enzim diperoleh dari hasil isolasi bagian daging dari buah nanas. Buah nanas yang digunakan merupakan buah nanas subang yang sudah matang. Ekstraksi bromelin dari bagian daging buah dari nanas sudah tepat karena aktivitas bromelin yang diisolasi dari bagian daging buah yang sudah matang menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan bagian buah lainnya.

Konsentrasi Protein Hidrolisat Kasein

Hasil pengukuran konsentrasi protein pada isolat kasein didapatkan hasil sebesar 2,234 mg/mL. Proses hidrolisis akan menghasilkan hidrolisat kasein dengan konsentrasi protein yang berbeda-beda yang secara umum lebih rendah dibandingkan isolat kasein utuh (Tabel 1).

Tabel 1 Konsentrasi protein kasein dan hidrolisat kasein

Protein/Peptida	Konsentrasi Protein (mg/mL)
Isolat kasein	2,234
Menit ke-0 (B0)	1,056
Menit ke-1 (B1)	1,043
Menit ke-2 (B2)	1,079
Menit ke-3 (B3)	1,096

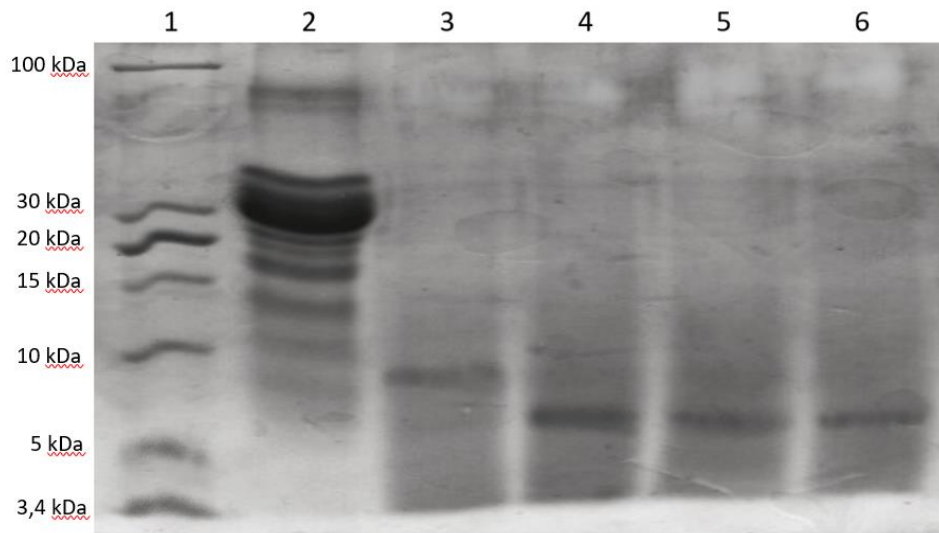
Nilai konsentrasi protein hidrolisat bromelin yang lebih kecil dibandingkan dengan isolat kasein dapat terjadi karena pewarna pada reagen Bradford tidak dapat berikatan dengan asam amino bebas seperti arginin dan lisin serta peptida dengan berat molekul sekitar 3 kDa dimana banyak ditemukan pada peptida bioaktif hasil hidrolisis oleh enzim (Congdon *et al.* 1993). Pewarna CBB tidak dapat membentuk kompleks dengan asam amino bebas maupun peptida sehingga sulit menghasilkan warna biru (Utami *et al.* 2016). Hidrolisat bromelin

memiliki konsentrasi protein yang bervariasi seiring waktu hidrolisis berlangsung. Hal ini mungkin disebabkan oleh sensitifitas dari pewarna CBB yang tidak dapat mendeteksi baik peptida pendek maupun asam amino bebas, sehingga tidak dapat dideteksi ketika terjadi hidrolisis lebih lanjut dari peptida pendek yang telah dihasilkan menjadi asam amino bebas. Sehingga waktu hidrolisis dalam hal ini tidak mempengaruhi secara langsung konsentrasi protein dari hidrolisat bromelin.

Profil Protein dan Peptida kasein Sebelum Fraksinasi

Berdasarkan hasil pada gel SDS-PAGE (Gambar 1), isolat kasein mengandung delapan buah pita berukuran sekitar 19,5 kDa; 26,4 kDa; dan 33,6 kDa; 10,8 kDa; 7,3 kDa; 13,1 kDa; 69,1 kDa; dan 18,1 kDa. Kemudian, jalur 3 hingga jalur 6 menunjukkan pita protein isolat kasein yang sudah terhidrolisis. Pada jalur 3 yang merupakan hidrolisat bromelin selama 0 menit ditemukan pita protein yang mempunyai berat molekul sekitar 7,3 kDa, sedangkan pada jalur 4, 5, dan 6 ditemukan pita protein pada posisi yang hampir sama yang diperkirakan mempunyai berat molekul sekitar 6,6 kDa. Proses hidrolisis kasein menghasilkan protein dengan berat molekul yang beragam.

Berdasarkan hasil visualisasi gel pada isolat kasein ditemukan 3 buah pita utama berukuran masing-masing 33,6 kDa, 26,4 kDa, dan 19,5 kDa. Ketiga pita tersebut merupakan sub unit kasein yang terdiri dari α -kasein yang berukuran 32 kDa, β -kasein yang berukuran 24 kDa, dan κ -kasein yang berukuran 19 kDa (Wang *et al.* 2013). Selain itu terdapat 5 pita lainnya dengan berat molekul berkisar antara 7,3 kDa hingga 69,1 kDa. Kelima pita tersebut diduga merupakan pengotor yang terkandung di dalam kasein yang terbentuk akibat proses pemisahan antara kasein dan whey yang kurang optimal. Pada hidrolisat menit ke-0 menunjukkan 1 buah pita protein baru dengan berat molekul sekitar 7,3 kDa.



Gambar 1 Profil SDS PAGE dari hidrolisat peptida dari kasein susu kambing. Jalur 1: marker LMW; jalur 2: isolat kasein; jalur 3-6: hasil hidrolisis kasein selama 0,1,2,3 menit

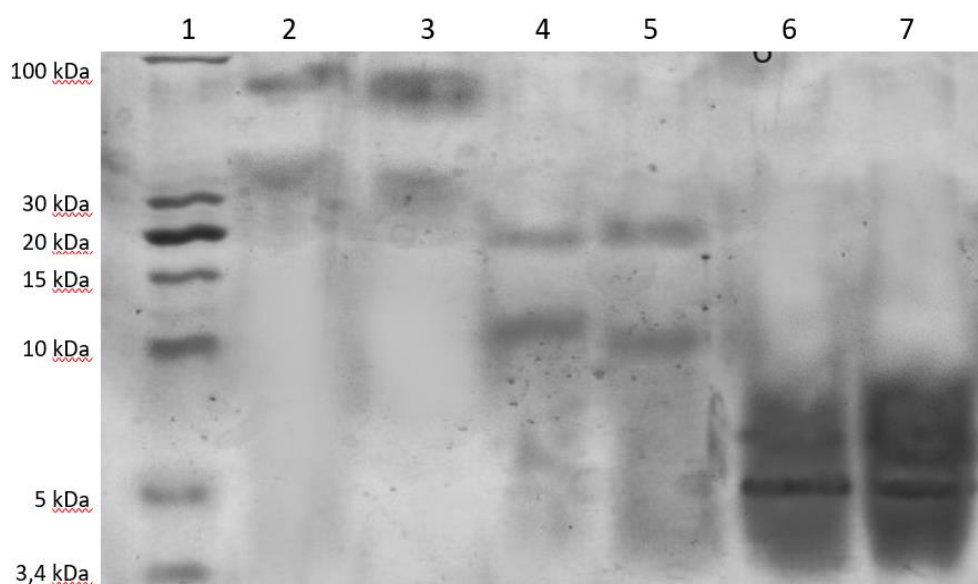
Meskipun kondisi hidrolisis langsung dihentikan pada saat enzim ditambahkan ke dalam substrat, namun reaksi enzimatik sudah sempat berjalan. Hal ini menyebabkan pita kasein yang ditemukan pada jalur 2 tidak lagi ditemukan pada jalur 3. Kecepatan prosen hidrolisis enzimatik juga dipengaruhi oleh pH dan suhu optimum enzim yang digunakan pada perlakuan hidrolisis. Hasil hidrolisat bromelin menit ke 1, 2, dan 3 menunjukkan 1 buah pita yang mirip dengan berat molekul sekitar 6,6 kDa dengan pita 7,3 kDa yang sudah menghilang. Pita protein ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis sudah terjadi lebih lanjut dimana dihasilkan pita protein yang terletak pada bagian bawah yang menandakan bahwa proses hidrolisis dengan enzim menghasilkan fragmen protein dengan berat molekul yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan berat molekul isolat kasein. Hal ini juga ditandai dengan tidak ditemukannya lagi pita ketiga sub unit kasein yaitu α -kasein, β -kasein, dan κ -kasein pada gel (telah terhidrolisis) (Kusumaningtyas *et al.* 2015b).

Profil Protein dan Peptida Sesudah Fraksinasi

Berdasarkan pita elektroforesis yang terbentuk pada gel (Gambar 2), pada jalur 2 dan 3 yang berisi fraksi peptida B0 dan B1 yang berukuran diatas 30 kDa mempunyai

satu buah pita protein pada bagian atas gel dengan berat molekul sekitar 65,9 kDa yang diduga merupakan fraksi immunoglobulin yang memiliki berat molekul sekitar 25-60 kDa (El-Hatmi *et al.* 2015). Kemudian untuk jalur 4 dan 5 yang berisi fraksi peptida B0 dan B1 yang berukuran dibawah 30 kDa menunjukkan dua buah pita protein masing-masing dengan berat molekul sekitar 25,1 kDa dan 13 kDa. Pita protein berukuran 25,1 kDa memiliki berat yang mirip dengan fraksi β -kasein yang berukuran 24 kDa (Wang *et al.* 2013). Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapat sejumlah kecil fraksi β -kasein yang belum terhidrolisis secara sempurna. Sedangkan, pita protein berukuran 13,0 kDa merupakan fragmen peptida baru hasil hidrolisis kasein yang masih belum teridentifikasi.

Pada jalur 6 dan 7 yang berisi fraksi peptida B0 dan B1 berukuran dibawah 10 kDa terdapat satu buah pita protein dengan berat molekul sekitar 5 kDa yang cenderung terletak dibagian bawah gel. Perbedaan letak pita pada gel antara ketiga fraksi menandakan bahwa proses fraksinasi berhasil. Pita protein berukuran 5 kDa pada fraksi <10 kDa diduga merupakan hasil hidrolisis fragmen α -S₂-kasein yang bernama Casocidin-I yang memiliki berat molekul sekitar 4,8 kDa.

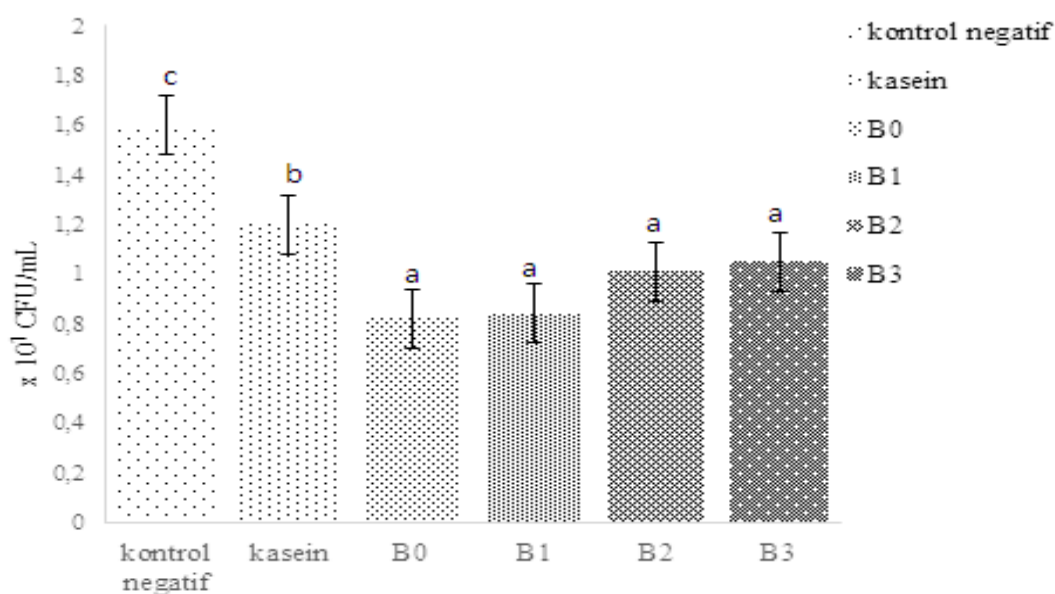


Gambar 2 Profil SDS PAGE dari hasil fraksinasi peptida hidrolisat bromelin selama 0 dan 1 menit. Jalur 1: marker LMW; jalur 2: B0>30 kDa; jalur 3: B1>30 kDa; jalur 4: B0<30 kDa; jalur 5: B1<30 kDa; jalur 6 : B0<10 kDa; jalur 7 : B1<10 kDa.

Aktivitas Antibakteri Peptida Hidrolisat Bromelin terhadap *Staphylococcus aureus*

Aktivitas penghambatan diukur berdasarkan jumlah koloni bakteri yang terbentuk. Pada kasein dan seluruh hidrolisat bromelin selama 0, 1, 2 dan 3 menit

mempunyai jumlah koloni bakteri yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif dengan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) (Gambar 3). Hidrolisat bromelin selama 0, 1, 2, dan 3 menit memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda secara signifikan dengan kasein ($P < 0,05$).



Gambar 3 Aktivitas antibakteri peptida hasil hidrolisis kasein susu kambing sebelum fraksinasi terhadap *Staphylococcus aureus*

Proses hidrolisis meningkatkan aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*. Hidrolisat B0 dan B1 mempunyai aktivitas paling baik dibandingkan hidrolisat lainnya karena mampu menurunkan jumlah koloni

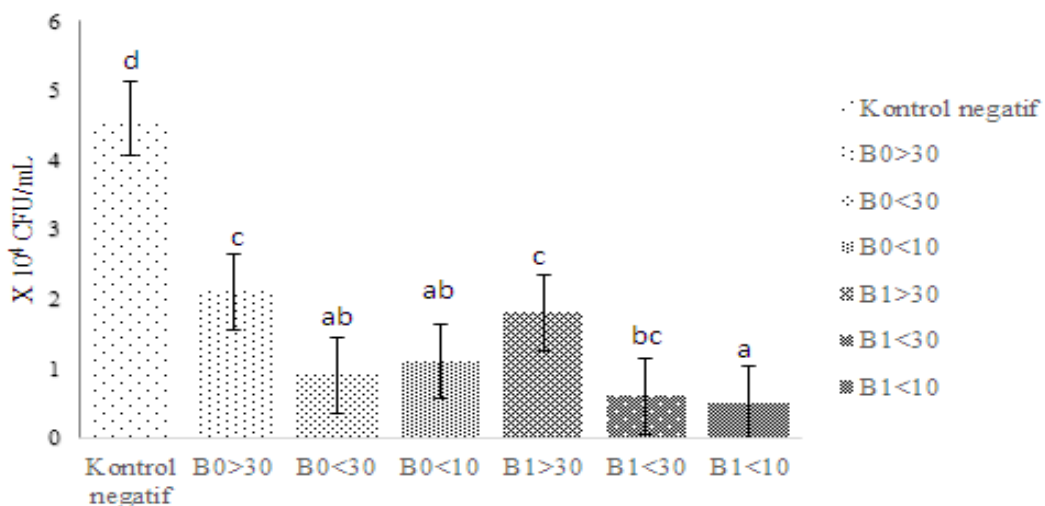
Staphylococcus aureus sebesar 1 log. Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu hidrolisis berpengaruh pada hidrolisat dan peptida yang dihasilkan maupun bioaktivitasnya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kusumaningtyas *et al* (2015a), hidrolisat peptida hasil hidrolisis enzim bromelin kasar dengan substrat kasein memiliki aktivitas penghambatan yang cukup baik terhadap *Staphylococcus aureus*. Hidrolisis protein susu menghasilkan peptida antimikrob diantaranya adalah casecidin dan isracidin. Penelitian yang dilakukan oleh Triprisila *et al* (2016) juga menunjukkan bahwa fragmen α -s2 kasein dengan konsentrasi berkisar antara 1,25 sampai 5 (mg/mL) memiliki aktivitas penghambatan terhadap beberapa bakteri seperti *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri antar peptida yang berbeda-beda dipengaruhi oleh susunan dan karakteristik asam amino yang dimiliki oleh masing-masing peptida. Aktivitas antibakteri hidrolisat bromelin yang lebih baik dibandingkan dengan protein kasein dikarenakan peptida yang berasal dari pemecahan protein akan mengalami

perubahan karakter fisiko-kimia dibandingkan protein alaminya. Degradasi protein menjadi peptida oleh enzim akan meningkatkan aktivitas biologis yang dimiliki, dalam hal ini antibakteri. Selain itu, peptida memiliki ukuran yang lebih kecil sehingga dapat lebih mudah masuk kedalam pori-pori pada membran bakteri, sehingga memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi daripada protein dengan bobot molekul yang lebih besar (Esmailpour *et al*. 2017). Selanjutnya hidrolisat B0 dan B1 difraksinasi lebih lanjut untuk memperkirakan ukuran peptida yang aktif sebagai antibakteri.

Aktivitas Antibakteri Peptida Hidrolisat Bromelin Terpilih Setelah Fraksinasi

Gambar 4 menunjukkan aktivitas penghambatan yang nyata ($P < 0,05$) antara semua fraksi hidrolisat yang diujikan dengan kontrol. Peptida dengan berat molekul kecil (< 30 kDa) mempunyai aktivitas yang lebih baik dibandingkan berat molekul besar (> 30 kDa). Peptida dengan berat molekul dibawah 10 kDa untuk hidrolisat 1 menit (B1) menunjukkan aktivitas penghambatan paling tinggi.



Gambar 4 Aktivitas antibakteri peptida hasil hidrolisis kasein susu kambing setelah fraksinasi menggunakan membran *cut off* 30 kDa dan 10 kDa terhadap *Staphylococcus aureus*

Kusumaningtyas *et al*. (2015a) melaporkan bahwa fraksi peptida berukuran kecil mempunyai kemampuan antibakteri yang paling tinggi. Aktivitas antibakteri

tertinggi dari hidrolisat B0 adalah fraksi peptida dibawah 30 kDa. Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dapat dihambat dengan lebih baik oleh peptida hasil

fraksinasi (penurunan jumlah koloni sebesar 2 log) dibandingkan dengan hidrolisat sebelum dilakukan fraksinasi (penurunan jumlah koloni sebesar 1 log), mengindikasikan bahwa fraksinasi penting untuk aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Metode fraksinasi dengan menggunakan membran *cut off* berfungsi untuk memekatkan peptida berdasarkan berat molekul tertentu dan menghilangkan protein yang tidak terhidrolisis dan kontaminan seperti garam sehingga aktivitasnya meningkat (Muro *et al.* 2013). Interaksi elektrostatis antar peptida yang memiliki perbedaan karakteristik akan memberikan pengaruh yang kurang baik terhadap kemampuan peptida tersebut. Fraksinasi dan purifikasi akan mengurangi interaksi antar peptida dengan karakteristik yang berbeda sehingga aktivitas antibakterinya meningkat (Hayes *et al.* 2006).

Aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh peptida dipengaruhi oleh bentuk serta susunan asam amino yang dimiliki. Peptida bioaktif yang memiliki sifat antimikrob melakukan aktivitas penghambatannya dengan 3 cara yaitu berinteraksi dengan membran, penetrasi ke dalam membran, dan berinteraksi dengan komponen seluler yang lain. Secara garis besar, kutub positif (kation) dari peptida berinteraksi dengan kutub negatif yang terdapat pada bagian lipida di permukaan luar dinding sel bakteri. Selanjutnya, peptida menyisip dengan posisi paralel pada *bilayer* membran sel bakteri, ke dalam membran sitoplasma yang kemudian mengakibatkan gangguan pada membran berupa penipisan, pembentukan pori, dan modifikasi elektrostatis. Selanjutnya peptida berpindah melalui membran, berdifusi ke dalam sitoplasma untuk mencapai target intraseluler. Interaksi dengan komponen seluler lainnya dilakukan dengan cara menghambat pembelahan sel, DNA, dan RNA yang berguna untuk sintesis protein pada sel bakteri. Bakteri akan mati karena sintesis

protein nya akan terhambat dan akan terdenaturasi sehingga mengganggu pembentukan DNA secara otomatis (autolisis) (Al Awwaly *et al.* 2015).

KESIMPULAN

Ekstrak enzim bromelin memiliki aktivitas proteolitik sebesar 0,43 U/ml. Proses hidrolisis kasein oleh bromelin menurunkan konsentrasi protein yang terdapat pada kasein, dengan konsentrasi protein berkisar antara 1,056 sampai 1,096 mg/mL. Protein kasein susu kambing dengan berat molekul 19,5 sampai 33,6 kDa telah terhidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya pita dengan berat molekul yang berkisar diantara 6,6 kDa sampai 7,3 kDa. Berdasarkan uji antibakteri, kasein dan hidrolisat hasil hidrolisis kasein susu kambing dengan bromelin dapat menghambat *Staphylococcus aureus*. Seluruh hidrolisat bromelin memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dari isolat kasein. Metode fraksinasi dengan membran yang dilakukan pada penelitian dapat dikatakan berhasil dilakukan berdasarkan perbedaan letak pita pada gel SDS-PAGE yang terbentuk antara ketiga fraksi peptida. Fraksi peptida dengan berat molekul kecil (<10 kDa) memberikan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang lebih baik dibandingkan peptida dengan berat molekul besar. Eksplorasi lebih lanjut dapat dilakukan formulasi produl bioaktif berbasis susu kambing baik sebagai pengawet alami maupun untuk pendamping pengobatan yang menggunakan antibiotik.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Awwaly KU, Triatmojo S, Erwanto Y, Artama WT. 2015. Komponen bioaktif dalam daging dan sifat fungsionalnya: sebuah kajian pustaka. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*. 10(1): 22-34.
- Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen Physiol* 22(1): 79-89.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(7): 248-254.
- Congdon, RW, Muth GW, Splittgerber AG. 1993. The binding interaction of Coomassie Blue with proteins. *Analyt Biochem.* 213(1): 407-413.
- El-Hatmi H, Jrad Z, Salhi I, Aguib A, Nadri A, Khorchani T. 2015. Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donker, goat and cow milk. *Mljekarstvo.* 65(3): 159-167. DOI: 10.15567/mljekarstvo.2015.0302
- Esmailpour M, Ehsani MR, Aminlari M, Shekarfoush S, Hoseini E. 2017. antimicrobial peptides derived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biosciences and Technology.* 7(1):65-72.
- Hayes M, Ross RP, Fitzgerald FG, Hill C, Stanton C. 2006. Casein-derived antibacterial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl Env Microb.* 72(1): 2260-2263. DOI: 10.1128/AEM.72.3.2260-2264.2006.
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2015a. Aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan ekstrak kasar bromelin. *J Teknol dan Industri Pangan.* 26(2): 179-188. Doi: 0.6066/jtip.2015.26.2.179
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2015b. Antimicrobial and antioxidative properties of peptides from goat milk hydrolyzed with various protease. *JITV.* 20(3): 175-183.
- Lestari D, Soesilo VV. 2017. Aktivitas antibakteri peptida kasein susu kambing hidrolisis oleh papain terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmu Pangan dan Hasil Pertanian.* 1(2): 81-92.
- Marcos JF, Manzanares P. 2013. Antimicrobial peptides. Di dalam: Lagaron JM, Ocio MJ, Lopez-Rubio A, editor. *Antimicrobial Polymers.* Hoboken(US): John Wiley & Sons.
- Mohanty D, Jena R, Choudhury PK, Pattnaik R, Mohapatra S, Saini MR. 2016. Milk derived antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Food Properties.* 19(1): 837-846.
- Muro C, Riera F, Fernandez A. 2013. Advance in the fractionation of milk biopeptides by means of membran processes. *Licensee in Tech.* pp: 241-266.
- Padaga MC dan Aulanni'am. 2017. Susu sebagai nutrasetika untuk penyakit gangguan metabolic. Malang(ID): Universitas Brawijaya.
- Rosyani D. 2018. Aktivitas antibakteri peptida bioaktif kasein susu kambing hasil hidrolisis dengan ekstrak kasar bromelin [skripsi]. Jakarta: Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya.
- Setyawardani T. 2017. Membuat keju, *yoghurt*, dan kefir dari susu kambing. Jakarta(ID): Penebar Swadaya.
- Singh P, Benjakul S, Masqsood S, Kishimura H. 2011. Isolation and characterization of collagen extracted from skin of stripped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chain* :124(1): 97-105.
- Triprisila LF, Suharjono S, Christianto A, Fatchiyah F. 2016. The comparing of antimicrobial activity of CSN1S2 protein of fresh milk and yoghurt goat breed ethawah inhibited the pathogenic bacteria. *Mater Sociomed.* 28(4): 244-248. DOI: 10.5455/msm.2016.28.244-248
- Utami P, Lestari S, Lestari SD. 2016. Pengaruh metode pemasakan terhadap komposisi kimia dan asam amino ikan seluang

(*Rasbora argyrotaenia*). Jurnal Teknologi Hasil Perikanan 5(1): 73-84

Wang J, Su Y, Jia F, Jin H. 2013. Characterization of casein hydrolyzates derived from enzymatic hydrolysis. Chem Cent J 7(62):1-8.