

AKTIVITAS ANTIBAKTERI PEPTIDA KASEIN SUSU KAMBING HIDROLISIS OLEH PAPAIN TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*

(ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GOAT MILK CASEIN PEPTIDES HYDROLYZED
BY PAPAIN ENZYME TOWARD *Pseudomonas aeruginosa*)

Diana Lestari^{1*}, Via Venila Soesilo²

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya

²Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya

*Korespondensi E-mail: diana.lestari@atmajaya.ac.id

ABSTRACT

Goat milk contains approximately 3.4% protein, including bioactive peptides. Bioactive peptides (as example antibacterial peptides) are specific protein fragments that have beneficial effect for human body functions and can be obtained by enzymatic hydrolysis process. Research about bioactive peptides from Indonesian goat milk is still a few that has been reported. Therefore the objectives of this research were to analyze protein and peptides profile from Etawa goat milk casein hydrolyzed by papain, and to analyze antibacterial activity of the peptides toward *Pseudomonas aeruginosa*. Casein was isolated from fresh goat milk and hydrolyzed for 0, 1, 3, 10, and 15 minutes at 50°C by papain. Protein and peptides profile were analyzed by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) method (20% gel). The results showed that protein bands of hydrolyzed casein were getting thinner as the hydrolysis process time increased. Antibacterial activity of casein isolate and hydrolyzed peptides were analyzed by using microplate reader for 24 hours. The results showed that casein isolate and peptides could inhibit the bacterial growth by extending the lag phase of bacterial growth. The casein isolate and peptides hydrolyzed for 3 minutes has the best antibacterial activity toward *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: antibacterial, antibacterial peptides, casein, goat milk, SDS-PAGE

ABSTRAK

Susu kambing mengandung sekitar 3.4% protein, termasuk di dalamnya peptida bioaktif. Peptida bioaktif (contohnya peptida antibakteri) adalah fragmen protein spesifik yang bermanfaat bagi fungsi tubuh manusia dan bisa diperoleh melalui proses hidrolisis enzimatis. Penelitian mengenai peptida bioaktif dari susu kambing Indonesia masih belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis profil protein dan peptida dari kasein susu kambing Etawa yang dihidrolisis oleh papain dan menganalisis aktivitas antibakteri peptida terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Kasein diisolasi dari susu kambing segar dan dihidrolisis selama 0, 1, 3, 10, dan 15 menit pada 50°C dengan papain. Profil protein dan peptida dianalisis dengan metode *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (konsentrasi gel 20%). Hasil analisis menunjukkan bahwa pita protein hasil hidrolisis menjadi semakin tipis seiring dengan bertambahnya waktu hidrolisis. Aktivitas antibakteri dari isolat kasein dan peptida hasil hidrolisis dianalisis menggunakan *microplate reader* selama 24 jam. Hasil analisis menunjukkan Isolat kasein dan peptida 3 menit menunjukkan aktivitas antibakteri dengan memperpanjang fase *lag* yang paling baik terhadap terhadap *P. aeruginosa* dibandingkan peptida lainnya.

Kata kunci : antibakteri, kasein, peptida antibakteri, SDS-PAGE, susu kambing

PENDAHULUAN

Susu adalah salah satu sumber zat gizi yang bermanfaat bagi kesehatan. Susu kambing merupakan salah satu jenis susu yang mulai diminati untuk dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Susu kambing mengandung zat gizi seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral, vitamin, dan asam amino esensial (Sagitarini *et al.* 2013). Susu kambing mengandung sekitar 3.4% protein (Triprisila *et al.* 2016). Kandungan utama dalam protein susu kambing adalah 80% kasein dan 20% *whey*. Kasein dibagi menjadi α -kasein, β -kasein, dan κ -kasein, sedangkan *whey* dibagi menjadi α -laktalbumin, β -laktoglobulin, serum albumin, imunoglobulin, dan glikomakropeptida (Mohanty *et al.* 2015).

Pada umumnya protein dan peptida dalam susu memiliki aktivitas biologis, namun aktivitas bioaktif beberapa protein hanya dapat berjalan setelah mengalami proses hidrolisis (Kusumaningtyas 2013). Proses hidrolisis enzimatik dapat dilakukan dengan menggunakan enzim proteolitik seperti papain. Papain (EC 3.4.22.2) merupakan enzim proteolitik famili protease sistein yang terdapat pada buah pepaya (Amri dan Mamboya 2012).

Peptida bioaktif adalah fragmen protein spesifik yang bermanfaat baik dalam kesehatan tubuh (Kusumaningtyas 2013). Salah satu sifat peptida bioaktif yang banyak diteliti adalah sebagai antibakteri. Peptida antibakteri merupakan peptida atau protein berukuran kecil yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Peptida ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif (Marcos dan Manzanares 2013).

Penelitian mengenai peptida antibakteri sudah dilakukan dari susu domba, sapi, dan kambing. Peptida α_{s2} -kasein dari susu domba dan κ -kasein dari susu sapi yang dihidrolisis oleh pepsin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Listeria innocua* (López-Expósito *et al.* 2007). Peptida casecidin 15 dan casecidin 17 (β -kasein) dari susu sapi dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* DH5 α dan *E. coli* DPC6053 (Birkemo *et al.* 2009). Peptida α_{s2} -kasein dari susu kambing efektif dalam menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *Shigella flexneri* (Triprisila *et al.* 2016).

Penelitian peptida bioaktif dari kasein susu kambing Indonesia masih belum banyak dilaporkan dibandingkan dari susu sapi maupun susu kambing luar negeri. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis profil protein dan peptida dari kasein susu kambing Indonesia yang dihidrolisis oleh papain dengan metode SDS-PAGE dan menganalisis aktivitas antibakteri peptida terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu susu kambing Etawa segar yang diperoleh dari peternakan di Bogor, enzim papain (Merck), *marker* LMW (PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder), *tryptic soy broth* (TSB), dan isolat bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637). Alat yang digunakan antara lain yaitu alat sentrifugasi dingin Sorvall® Legend T/RT, alat sentrifugasi Sorvall® Pico, *freeze dryer*, alat elektroforesis Mini-PROTEAN® 3 Cell dan Bio-Rad, spektrofotometer Genesys 20, inkubator Memmert, dan *microplate reader* Infinite® 200 PRO NanoQuant.

Metode

Preparasi dan Isolasi Kasein Susu Kambing. Susu kambing segar disentrifugasi 2000 g selama 30 menit pada 4°C, lalu lapisan lemaknya dipisahkan. Susu dipasteurisasi selama 15 detik pada 72°C. Susu ditambahkan HCl 2N pada suhu 40°C hingga pH 4,6 untuk mengisolasi kasein dengan pengendapan isoelektrik. Kemudian susu disentrifugasi 7.100 g selama 30 menit untuk memisahkan kasein dan *whey*. Endapan kasein dibilas akuades sebanyak 3 kali pada 7.100 g selama 5 menit. Kasein dikeringkan dengan *freeze-dry* dan disimpan pada suhu -20°C (Yoshida *et al.* 2000; Bezerra *et al.* 2013).

Hidrolisis Kasein Susu Kambing. Kasein dilarutkan dalam *buffer* fosfat 0,05 M pH 7 dengan konsentrasi 15% b/v. Enzim papain dilarutkan dalam *buffer* fosfat dengan perbandingan 1:10 (b/v). Kemudian kasein dihidrolisis dengan enzim papain dengan perbandingan larutan kasein dan enzim 100:0.5 (v/v) pada pH 7 dan suhu 50°C dengan interval waktu 0, 1, 3, 10, dan 15 menit. Kasein yang tidak dihidrolisis dijadikan sebagai kontrol. Hidrolisis diberhentikan dengan pemanasan 80°C selama 15 menit. Hidrolisat (peptida) disentrifugasi 2.000 g selama 5 menit. Kemudian hidrolisat disterilisasi selama 15 menit pada 105°C dengan otoklaf (López-Expósito *et al.* 2007; Chalabi *et al.* 2014).

Pengukuran Konsentrasi Protein Hasil Hidrolisis. Uji konsentrasi protein dilakukan berdasarkan Bradford (1976), dengan standar menggunakan *bovine serum albumine* (BSA). Selanjutnya, sebanyak 14 buah tabung reaksi disiapkan. Tabung pertama sampai keenam diisi dengan larutan BSA, tabung ketujuh sampai ke-13 diisi dengan sampel hasil hidrolisis, dan tabung ke-14 diisi dengan akuades, masing-masing sebanyak 0,4 mL. Setiap tabung ditambahkan dengan 8 mL pereaksi Bradford. Kemudian larutan diaduk dengan vorteks dan didiamkan selama lima menit dalam suhu ruang. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm.

Pengukuran Aktivitas Papain. Uji aktivitas enzim papain dilakukan berdasarkan metode Anson (1938). Papain dilarutkan ke dalam *buffer* fosfat 50 mM pH 7,5, lalu campuran diaduk

dengan vorteks selama tiga menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit dan supernatannya diambil. Sebanyak 800 µL kasein 0,65% b/v (dilarutkan dengan *buffer* fosfat 50 mM pH 7,5) ditambahkan sebagai substrat ke tabung vial sampel dan blanko. Lalu campuran tersebut ditambahkan 200 µL sampel papain yang sudah dilarutkan ke dalam *buffer* fosfat pH 7,5. Larutan sampel dan blanko diaduk dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Larutan blanko dan sampel ditambahkan 500 µL TCA dingin dan diaduk dengan vorteks.

Setelah itu, pada blanko ditambahkan 200 µL sampel enzim yang sudah dilarutkan dalam *buffer* fosfat pH 7,5. Larutan sampel dan blanko diaduk dengan vorteks dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian blanko dan sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit, setelah itu supernatan dipindahkan ke tabung vial baru sebanyak 400 µL. Sebanyak satu mL Na₂CO₃ 0,4 M ditambahkan ke dalam sampel dan blanko dan diaduk dengan vorteks. Pereaksi Folin-Ciocalteu sebanyak 200 µL ditambahkan ke dalam sampel dan blanko, kemudian larutan diaduk dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Lalu larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm selama 10 menit, lalu absorbansi supernatan yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 660 nm. Sebagai standar digunakan tirosin.

Aktivitas papain dihitung dengan persamaan:

$$UA = \frac{[\text{tirosin}]}{V_{\text{enzim}}} \times \frac{1}{P} \times \frac{1}{T} \quad AS = \frac{UA}{[\text{protein}]}$$

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

Analisis Profil Peptida dengan SDS-PAGE. Metode SDS-PAGE dilakukan berdasarkan Laemmli (1970) dengan beberapa modifikasi oleh Singh *et al.* (2011). Sampel dilarutkan dalam larutan SDS 5% dengan perbandingan 1:5, lalu dipanaskan pada suhu 85°C selama 1 jam. Campuran disentrifugasi 2000 g selama 5 menit. Kemudian supernatan dicampur dengan *buffer* sampel (6% Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50% gliserol 50%, 20% SDS 10%, 5% β-merkaptotanol, 10% *bromophenol blue* 1%, 9% akuades) dengan perbandingan 1:1. Campuran tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Komposisi gel SDS-PAGE yang digunakan untuk gel pemisah 20% dan gel penahan 4%.

Volume sampel kasein yang dimasukkan ke dalam sumur SDS-PAGE sebanyak 4 µL, sedangkan sampel peptida hasil hidrolisis sebanyak 5 atau 6 µL. *Marker* LMW dijadikan sebagai standar protein. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 70 V selama sekitar 3 jam hingga *bromophenol blue* hampir mencapai bagian bawah gel. Setelah itu gel diwarnai dengan

larutan pewarna (0,1% Coomasie Brilliant Blue R-250, 45% metanol, 44,9% akuades, 10% asam asetat glasial) selama 15 menit dan pewarna dilunturkan dengan larutan peluntur (10% metanol, 10% asam asetat glasial, 80% akuades) selama 15 menit sebanyak 4 kali. Gel didiamkan selama semalam, lalu dibilas dengan akuades dan disimpan. Hasil SDS-PAGE dianalisis menggunakan aplikasi GelAnalyzer 2010a.

Analisis Aktivitas Antibakteri. Bakteri *P. aeruginosa* ditumbuhkan pada media TSB pada suhu 37°C selama semalam. Setelah semalam, suspensi bakteri diencerkan lima kali (setara dengan 10² CFU/mL). Larutan (sesuai dengan komposisi Tabel 1) dimasukkan ke dalam 96-well microplate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam microplate reader (López-Expósito *et al.* 2007; Kusumaningtyas *et al.* 2015). Pengujian dilakukan secara duplo.

Tabel 1 Komposisi larutan dalam 96-well microplate

	TSB (µL)	Air Steril (µL)	Antibiotik (µL)	Peptida (µL)	Bakteri (µL)
Kontrol positif	50	-	50	-	15
Kontrol negatif	50	50	-	-	15
Sampel	50	-	-	50	15

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Konsentrasi Protein Hasil Hidrolisis dan Aktivitas Papain

Kasein susu kambing yang diisolasi dari susu kambing segar (isolat kasein) mengandung protein sebesar 4,0445 mg/mL. Kemudian kasein dihidrolisis oleh papain dengan aktivitas 66,8800 U/mL selama 0, 1, 3, 5, 10, dan 15 menit dan diperoleh peptida dengan konsentrasi protein 1,6163 mg/mL untuk peptida 0 menit, 2,4665 mg/mL untuk peptida 1 menit, 2,0753 mg/mL untuk peptida 3 menit, 2,1082 mg/mL untuk peptida 10 menit, dan 1,3677 mg/mL untuk peptida 15 menit.

Tabel 2 Hasil pengukuran konsentrasi protein hasil hidrolisis

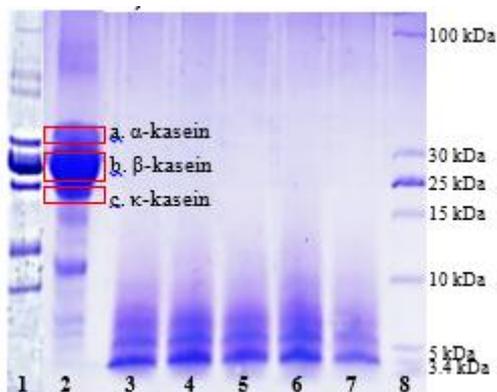
Protein/Peptida	Konsentrasi Protein (mg/mL)
Isolat kasein	4.0445
0 menit	1.6163
1 menit	2.4665
3 menit	2.0753
10 menit	2.1082
15 menit	1.3677

Tabel 3 Hasil pengukuran aktivitas papain

Ulangan ke-	Absorbansi	[Tirosin] (μM)	[UA] (U/mL)	[AS] (U/gr)
1	0,1780			
2	0,1550			
3	0,2020	83,6000	66,8800	2126,6280
4	0,1660			
5	0,1730			
6	0,1340			
Rata-rata	0,1680			

Analisis Profil Protein dan Peptida (SDS-PAGE)

Konsentrasi protein yang dimasukkan ke dalam sumur SDS-PAGE adalah 0,0162 mg untuk isolat kasein, 0,0081 mg untuk peptida 0 menit, 0,0123 mg untuk peptida 1 menit, 0,0104 mg untuk peptida 3 menit, 0,0126 mg untuk peptida 10 menit, dan 0,0082 mg untuk peptida 15 menit. Perbedaan konsentrasi protein masing-masing sampel menentukan tebal tipisnya pita protein yang dihasilkan pada gel SDS PAGE.



Gambar 1 Profil SDS-PAGE dari (1) susu kambing; (2) isolat kasein susu kambing; kasein yang terhidrolisis selama: (3) 0 menit, (4) 1 menit, (5) 3 menit, (6) 10 menit, (7) 15 menit; (8) *low molecular weight* (LMW) *marker*.

Berdasarkan hasil SDS-PAGE (Gambar 1), susu kambing menunjukkan 10 pita dengan berat molekul >100, 97, 77, 61, 30, 21, 17, 13, 8, dan 5 kDa. Isolat kasein susu kambing menunjukkan terdapat 14 pita dengan berat molekul 88, 79, 66, 32, 24, 19, 15, 14, 12, 9, 7, 6, 5, dan 4 kDa. Sedangkan kasein yang terhidrolisis (peptida) selama 0, 1, 3, 10, dan 15 menit menunjukkan profil yang sama yaitu terdapat 4 pita dengan berat molekul 8, 6, 5, dan 4 kDa.

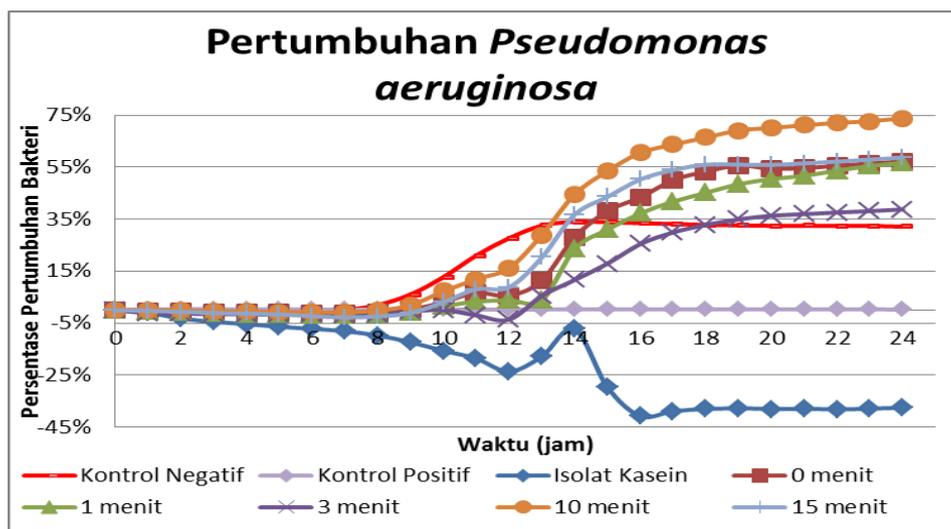
Konsentrasi protein (Tabel 2) dari isolat kasein akan menurun setelah melalui proses hidrolisis oleh papain. Profil dan berat molekul dari protein dan peptida dapat ditentukan dengan metode SDS-PAGE. Hasil SDS-PAGE (Gambar 1) menunjukkan bahwa pada isolat kasein terdapat pita berukuran 32, 24, dan 19 kDa yang masing-masing merupakan α -kasein, β -kasein, dan κ -kasein (Wang *et al.* 2013; Costa *et al.* 2014). Susu kambing mengalami proses hidrolisis saat isolasi kasein dengan penambahan HCl 2 N sehingga isolat kasein memiliki jumlah pita lebih banyak dibandingkan dengan susu kambing.

Hidrolisis kasein susu kambing dilakukan pada suhu optimum papain yaitu 50°C dan pada pH 7 dengan perbandingan substrat:enzim 100:0.5. Papain dapat menghidrolisis kasein dengan baik sehingga pita isolat kasein yang pada awalnya ada 14 pita menjadi hanya tersisa 4 pita saja. Papain dapat mendegradasi α -kasein, β -kasein, κ -kasein, dan protein yang berukuran sekitar 66-88 kDa secara sempurna sehingga pita-pitanya sudah tidak terlihat lagi setelah proses hidrolisis. Pita protein dari kasein yang terhidrolisis (peptida) juga menjadi semakin tipis seiring dengan bertambahnya waktu hidrolisis, sehingga pita protein paling tipis merupakan pita dari peptida 15 menit.

Dalam penelitian Chalabi *et al.* (2014), pita hasil hidrolisis kasein oleh papain pada pH 7 dengan perbandingan substrat:enzim 100:1 juga menghasilkan pita-pita berukuran di bawah 14 kDa. Namun profil pita yang dihasilkan pada penelitian tersebut sedikit berbeda dengan profil pada penelitian ini karena proses hidrolisis dilakukan pada suhu 37°C selama satu atau dua jam.

Analisis Aktivitas Antibakteri

Proses hidrolisis enzimatis dapat menghasilkan peptida bioaktif yang mempunyai aktivitas biologis, seperti sebagai antibakteri, antioksidan, antihipertensi, dan anti-inflamasi (Kusumaningtyas 2013). Aktivitas antibakteri dari peptida dianalisis menggunakan *microplate reader* selama 24 jam. Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri gram negatif (*P. aeruginosa*). Aktivitas antibakteri dari tiap peptida ditunjukkan dengan membandingkan pertumbuhan bakteri dengan penambahan isolat kasein atau peptida dengan pertumbuhan bakteri pada kontrol negatif (air steril) dan kontrol positif (antibiotik).



Gambar 2. Penghambatan pertumbuhan *P. aeruginosa* oleh isolat kasein dan peptida.

Pertumbuhan *P. aeruginosa* mengalami penghambatan oleh isolat kasein dan peptida dengan memperpanjang fase *lag* (Gambar 2). Pada kontrol positif yaitu antibiotik, bakteri tidak mengalami pertumbuhan yang ditunjukkan oleh grafik yang konstan. Sedangkan pada kontrol negatif, bakteri terlihat mulai bertumbuh pada sekitar jam ke-8 dan mencapai puncak pada jam ke-13. Peptida 10, dan 15 menit menunjukkan aktivitas yang hampir sama, yaitu bakteri mulai bertumbuh pada sekitar jam ke-9 dan mencapai puncak pada jam ke-17, sehingga dapat dikatakan memperpanjang fase *lag* selama satu jam dan menunda tercapainya fase puncak selama 4 jam. Peptida 0 dan 1 menit menunjukkan hasil yang lebih baik yaitu pertumbuhan dimulai pada jam ke-10 dan mencapai puncak pada jam ke-19. Sedangkan peptida 3 menit dan isolat kasein menunjukkan perpanjangan fase *lag* yang paling lama yaitu mulai bertumbuh pada jam ke-12. Berdasarkan Gambar 2 juga dapat dilihat peptida 3 menit tampak mengalami pertumbuhan yang lambat dan belum mencapai puncak setelah 24 jam, sedangkan isolat kasein selain pertumbuhan baru dimulai di jam ke-12, fase puncak segera dicapai dan menunjukkan pertumbuhan yang negatif, yang artinya setelah kontak dalam waktu yang cukup lama maka isolat kasein dapat menurunkan konsentrasi bakteri.

Isolat kasein dan peptida 3 menit menunjukkan aktivitas antibakteri dengan memperpanjang fase *lag* yang paling lama terhadap terhadap *P. aeruginosa* dibandingkan peptida lainnya. Aktivitas antibakteri dari peptida dapat berbeda-beda terhadap setiap spesies (Mondhe *et al.* 2014).

Pada isolat kasein, terjadi pola penurunan konsentrasi bakteri uji *P. aeruginosa* (Gambar 2) setelah melewati puncak fase *log* dari pertumbuhan bakteri. Penurunan konsentrasi bakteri diduga disebabkan oleh dua faktor, yaitu karena dibutuhkan waktu kontak yang lebih lama antara protein dengan bakteri agar antibakteri dapat bekerja (perlu dilakukan pengecekan lebih lanjut), atau karena nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri

sudah habis, sehingga bakteri memasuki fase stasioner kemudian fase kematian. Fase kematian dapat terjadi karena sel bakteri kekurangan energi dan juga terjadinya perubahan pH sehingga sel bakteri mengalami proses lisis (Al-Qadiri *et al.* 2008).

Peptida yang menunjukkan hasil aktivitas antibakteri terbaik (peptida 0, 1, dan 3 menit) merupakan peptida dari hasil hidrolisis kasein dalam jangka waktu hidrolisis yang lebih singkat atau bahkan berupa isolat kasein. Hal ini dikarenakan waktu hidrolisis yang singkat, menyebabkan konsentrasi protein yang terkandung masih cukup tinggi. Selain itu berdasarkan hasil SDS-PAGE, isolat kasein, peptida 0 menit, peptida 1 menit, dan peptida 3 menit menunjukkan pita yang lebih tebal dibandingkan peptida 15 menit yang merupakan hasil hidrolisis paling lama. Maka semakin tebal pita pada hasil SDS-PAGE, aktivitas antibakterinya cenderung semakin tinggi juga.

Protein dan peptida hasil hidrolisis dari kasein susu kambing dalam penelitian ini dapat disebut sebagai agen bakteriostatik karena bakteri tidak langsung tumbuh setelah berinteraksi dengan peptida. Dalam penelitian ini terjadi perpanjangan fase *lag* pertumbuhan bakteri sehingga dapat disimpulkan bahwa pertumbuhan bakteri menjadi terhambat (Leekha *et al.* 2011).

Dalam penelitian Esmailpour *et al.* (2016), kasein dihidrolisis menggunakan enzim tripsin, fisin, dan kombinasi keduanya. Setelah itu, hidrolisat difraksinasi berdasarkan ukurannya dengan membran ultrafiltrasi dengan pemotongan 10, 5, dan 3 kDa. Hidrolisat hasil hidrolisis menggunakan fisin yang berukuran kurang dari 3 kDa menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Berdasarkan penelitian ini dapat diketahui bahwa aktivitas antibakteri dapat berbeda-beda tergantung pada jenis enzim yang digunakan untuk memecah protein dalam sampel. Ukuran dan komposisi (sifat) dari peptida juga dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri yang dihasilkan.

Mekanisme peptida antibakteri dalam menghambat bakteri dapat berbeda-beda. Mekanisme ini dapat dipengaruhi oleh sifat dan komposisi asam amino dari peptida dan juga jenis bakteri yang diujikan. Pada umumnya peptida dapat berinteraksi dengan membran bakteri, namun ada juga peptida antibakteri yang dapat melewati membran untuk masuk ke dalam sel bakteri. Interaksi peptida dengan membran bakteri dipengaruhi oleh peptida dan komponen lipid dari membran bakteri. Peptida antibakteri biasanya mengandung lebih banyak asam amino hidrofobik, namun tetap bersifat amfifatik. Kasein memiliki asam amino hidrofobik yang berkelompok bersama, sehingga peptida yang dihasilkan dari proses hidrolisis kasein dapat menjadi kandidat agen antibakteri yang baik (Esmailpour *et al.* 2016).

Pengetahuan mengenai asam amino dan peptida spesifik terhadap aktivitas biologis yang dihasilkan masih kurang sehingga tidak dapat dipastikan bahwa sekuens amino tertentu

hanya dapat mempunyai satu jenis aktivitas saja. Mekanisme dari peptida antibakteri juga dapat berbeda-beda tergantung pada jenis peptida.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis SDS-PAGE, semakin lama waktu hidrolisis maka semakin tipis pita yang dihasilkan. Isolat kasein susu kambing menunjukkan 14 pita. Sedangkan peptida 0, 1, 3, 10, dan 15 menit menunjukkan profil yang sama yaitu 4 pita dengan berat molekul 8, 6, 5, dan 4 kDa. Papain dapat mendegradasi α -kasein, β -kasein, κ -kasein, dan protein protein yang berukuran sekitar 66-88 kDa secara sempurna sehingga pita-pita sudah tidak terlihat lagi setelah proses hidrolisis.

Berdasarkan analisis aktivitas antibakteri, peptida dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan memperpanjang fase *lag* dari pertumbuhan bakteri. Isolat kasein dan peptida 3 menit menunjukkan aktivitas antibakteri dengan memperpanjang fase *lag* yang paling baik terhadap terhadap *P. aeruginosa* dibandingkan peptida lainnya. Dalam penelitian ini, peptida yang menunjukkan hasil aktivitas antibakteri merupakan peptida dari hasil hidrolisis kasein dalam jangka waktu hidrolisis yang lebih singkat dengan konsentrasi protein yang masih cukup tinggi. Semakin tebal pita pada hasil SDS-PAGE, aktivitas antibakterinya cenderung semakin tinggi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kasein susu kambing yang dihidrolisis oleh papain dapat menghasilkan peptida antibakteri yang bersifat bakteriostatik sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat. Perlakuan perbedaan konsentrasi papain yang digunakan, waktu hidrolisis, suhu, dan pH dapat dilakukan agar pita berukuran besar tidak terhidrolisis sempurna.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami tujukan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Fakultas.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhazmi A. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* – pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Int J Biol* 7(2):44-67. doi: 10.5539/ijb.v7n2p44
- Al-Qadiri HM, Al-Alami NI, Lin M, Al-Holy M, Cavinato AG, Rasco BA. 2008. Studying of the bacterial growth phases using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J Rapid Meth Aut Mic* 16:73–89. doi: 10.1111/j.1745-4581.2008.00117.x
- Anson ML. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22(1):79-89.

- Bezerra VS *et al.* 2013. Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus Linnaeus*, 1758) obtained by papain action. *Food Sci Technol* 33(3): 513-520. doi: 10.1590/S0101-20612013005000074
- Birkemo GA, O'Sullivan O, Ross RP, Hill C. 2009. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J Appl Microbiol* 106(1):233-40. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03996.x
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(7):248-254.
- Chalabi M, Khademi F, Yarani R, Mostafaie A. 2014. Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: a comparative study of actinidin with papain. *Appl Biochem Biotechnol* 172(8):4025-4037. DOI 10.1007/s12010-014-0812-7
- Costa WKA, Souza EL, Beltrao-Filho EM, Vasconcelos GKV, Santi-Gadelha T, Gadelha CAA, Franco OL, Queiroga RCRE, Magnani M. 2014. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in Northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PLoS One* 9(3): e93361. doi: 10.1371/journal.pone.0093361
- Esmailpour M, Ehsani MR, Aminlari M, Shekarforoush S, Hosein E. 2016. Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comp Clin Pathol* 25(3):599-605.
- Kusumaningtyas E. 2013. Peran peptida susu sebagai antimikroba untuk meningkatkan kesehatan. *WARTAZOA* 23(2):63-75. DOI: 10.14334/wartazoa.v23i2.716
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2015. Aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan ekstrak kasar bromelin. *J Teknol dan Industri Pangan* 26(2):179-188. DOI: 10.6066/jtip.2015.26.2.179
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685. doi:10.1038/227680a0
- Leekha S, Terrell CL, Edson RS. 2011. General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc* 86(2): 156-167. doi: 10.4065/mcp.2010.0639
- López-Expósito I, Quiros A, Amigo L, Recio I. 2007. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait* 87:241-249. DOI: 10.1051/lait:2007019
- Marcos JF, Manzanares P. 2013. Antimicrobial peptides. Di dalam: Lagaron JM, Ocio MJ, Lopez-Rubio A, editor. *Antimicrobial Polymers*. Hoboken: John Wiley & Sons.
- Mohanty D *et al.* 2015. Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *Int J Food Prop* 19(4):837-846. doi: 10.1080/10942912.2015.1048356

- Mondhe M, Chessher A, Goh S, Good L, Stach JEM. 2014. Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs. *PLoS ONE* 9(2):e89082. doi: 10.1371/journal.pone.0089082
- Sagitarini D, Utami S, Astuti TY. 2013. Kadar protein dan nilai viskositas susu kambing sapera di Cilacap dan Bogor. *JIP* 1(3):1057-1063.
- Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chem* 124:97-105. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.111
- 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
- Wang J, Su Y, Jia F, Jin H. 2013. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chem Cent J* 7(62):1-8. doi: 10.1186/1752-153X-7-62
- Yoshida S, Wei Z, Shinmura Y, Fukunaga N. 2000. Separation of lactoferrin-a and -b from bovine colostrum. *J Dairy Sci* 83:2211–2215.