

ISOLASI KOMPONEN PEPTIDA BIOAKTIF DARI PROTEIN SUSU

(Isolation of bioactive peptide component from milk protein)

HELMI MUHAMMAD JAHYA¹⁾ DAN AMHAR ABUBAKAR²⁾

¹⁾Laboratorium Ilmu Produksi Ternak Perah

²⁾Laboratorium Teknologi Susu

Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian

Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

Abstract

The production of Casein hydrolysate with an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, was fractionated by two-step reverse phase high performance liquid chromatography. Only 1 fraction showed antihypertensive activity as measured by systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats after oral administration. Ten peptides in the fraction were further purified and identified by analysis of amino acid sequences. Each identified peptide was chemically synthesized, and the antihypertensive activity of each peptide was evaluated in spontaneously hypertensive rats. The synthetic peptide with a sequence of Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, found in β -casein, indicated strong antihypertensive activity from 2 to 10 h after oral administration of 2 mg of peptide/kg of BW, and the effect was maximal at 6 h after oral administration. Moreover, the antihypertensive effect of the peptide was dependent on the dosage of peptide from 0.5 to 2 mg of peptide/kg of BW.

PENDAHULUAN

Protein susu terdiri dari 2 komponen besar protein yaitu kasein dan protein whei. Jumlah kasein diperkirakan sekitar 76 - 86% dari kandungan total protein susu yang secara garis besar terbagi kedalam 4 jenis kasein yaitu: α_1 -kasein, α_2 -kasein, β -kasein dan κ -kasein.

Beberapa penelitian yang sudah dilakukan dan menemukan sejumlah sekuen asam amino (selanjutnya akan disebut dengan peptida) yang mempunyai kemampuan yang ampuh untuk menurunkan tekanan darah pada tikus (3).

Susu yang telah difermentasikan dengan *Lactobacillus (L.) helveticus* CP790 dan hidrolisat kasein yang diproduksi dengan enzim proteinase ekstraseluler menunjukkan kemampuan anti darah tinggi yang kuat pada tikus (SHR=spontaneously hypertensive rats) (9). Belum lama ini, telah diketemukan dua peptida penghambat enzim pengubah angiotensin yaitu, Val-Pro-Pro dan

Ile-Pro-Pro, yang dimurnikan dari susu yang telah difermentasikan dengan *L. helveticus* dan *Saccharomyces cerevisiae* (5) yang mempunyai kemampuan aktifitas anti darah tinggi. Beberapa peptida dari hidrolisat α_1 -kasein dan β -kasein yang diproduksi dengan menggunakan enzim proteinase ekstraseluler dari *L. helveticus* CP790 mempunyai aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin (8).

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi peptida anti darah tinggi dari hidrolisat kasein yang diproduksi oleh enzim proteinase dari *L. helveticus* CP790.

BAHAN DAN METODA

Material dan mikroorganisma

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), enzim pengubah angiotensin, pepsin, pankreatin, karboksipeptidase A, kasein kasar dan *L. helveticus* CP790.

Persiapan peptida dari hidrolisat kasein

Pemurnian enzim proteinase ekstraselular adalah fermentasi 4L 9% (wt/vol) NDM yang telah di pesturisasi, dengan *L. helveticus* CP790 (8), pengaturan pH sampai netral dilakukan dengan menambahkan 5N NaOH. Pemanenan sel dilakukan pada fase midlog pertumbuhan. Protein dihilangkan dari sel, dan diambil enzim proteinase ekstraselular. Untuk mendapatkan peptida, 1g kasein dilarutkan kedalam 100ml 20mM bufer pospat, pH 6.7, dan dicampurkan dengan 10µg enzim proteinase yang telah dimurnikan tadi. Setelah inkubasi pada 42 °C selama 15 jam, hidrolisat tersebut di panaskan pada suhu 80 °C selama 5 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik. Akhirnya, 700 mg peptida dengan berat molekul <10,000 Da diperoleh dengan penyaringan (kertas saring OMO10025) dan digunakan selanjutnya untuk peptida anti darah tinggi.

Pengukuran tekanan darah

Objek percobaan dalam penelitian ini digunakan tikus jantan dengan kisaran berat badan 330 sampai 360g, kisaran umur berkisar antara 18-25 minggu. Tikus tersebut masing-masing diberikan peptida yang telah dilarutkan dengan bufer pospat melalui pemasukan langsung ke dalam lambung dengan menggunakan sonde. Sebelum dilakukan pengukuran darah tinggi sebaiknya tikus yang telah diberikan sampel tersebut, dimasukkan ke dalam bok yang suhunya 45 °C selama 5 menit, selanjutnya tekanan darah sistolik diukur pada ekor tikus dengan menggunakan program elektrosigmomano-meter.

Pengukuran aktivitas penghambat enzim pengubah angiotensin

Aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin diukur dengan menggunakan metoda Cushman dan Cheung (2) dengan sedikit modifikasi. Masing-masing 20µl larutan peptida di pre-inkubasi dengan HHL bufer borat (3.8mM HHL, 0.1M borat, dan 0.3M NaCl; pH 8.3) pada suhu 37 °C selama 5 menit. Selanjutnya tambahkan 2 milli unit enzim pengubah angiotensin, dan pencampuran tersebut diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. satu unit enzim pengubah angio-

tensin memproduksi 1µM asam hippurik per menit dari HHL pada pH 8.3 dan 37 °C. Pelepasan asam hippurik tersebut diekstraksi dengan etil asetat. Konsentrasi peptida penghambat enzim pengubah angiotensin yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim pengubah angiotensin adalah didefinisikan sebagai IC₅₀.

Pemurnian peptida anti darah tinggi dengan Kromatografi cairan

Produksi hidrolisat kasein oleh enzim proteinase dilakukan analisis dengan menggunakan kromatografi cairan, menggunakan kolom µ-Bondasphere C-18 (3.9 mm x 150 mm). Peptida dialirkan dengan gradient linier dari solvent A (0.1% TFA dan H₂O) sampai 40% solvent B (0.1% TFA dan acetonitril) sampai 60 menit dengan kecepatan aliran 1.0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 215 nm. Untuk mengidentifikasi sekuen asam amino dari peptida, masing-masing peptida dimurnikan dengan RP-HPLC dengan memakai kolom yang sama dan gradient linier dari 10% solvent A ke 30% solvent B sampai 30 menit dengan kecepatan aliran 1.0 ml/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 215 nm. Untuk menentukan kandungan peptida anti darah tinggi dalam hidrolisat kasein, peptida dimurnikan dengan RP-HPLC dengan prosedur yang sama seperti yang telah dijelaskan di atas.

Pencernaan peptida anti darah tinggi dengan enzim pencernaan usus

Pencernaan pankreatin terhadap peptida sintetis dilakukan pada suhu 37 °C, dimana kedalam 200µl 0.1M Tris.HCl, pH 7.5 dimasukkan 100µg peptida dan 5µg enzim. Selanjutnya pencernaan pepsin terhadap peptida sintetis dilakukan pada 37 °C, dimana kedalam 200µl 0.1M Tris.HCl, pH 2.0, dimasukkan 100µg peptida dan 1µg enzim. Setelah dilakukan inkubasi selama 4 jam, masing-masing sample tersebut dipanaskan pada suhu 98 °C selama 10 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik. Untuk pencernaan karboksipeptidase A, 15µg peptida sintetis dilarutkan ke dalam 100µl bufer pencernaan (0.35M KCl dan 40mM Tris.HCl;

pH 7.5), dan tambahkan 10 unit karboksipeptida A. Setelah 10 jam inkubasi pada 37 °C, campuran reaksi dipanaskan selama 10 menit pada suhu 98 °C untuk menghentikan reaksi enzimatis dan selanjutnya analisis dengan menggunakan kromatografi cairan.

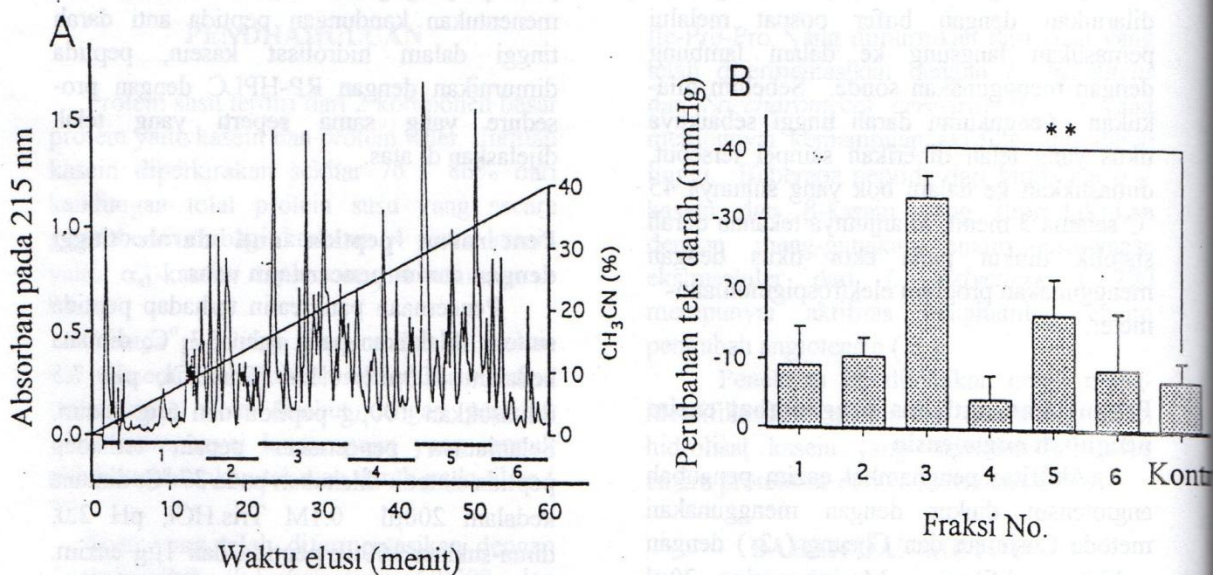
HASIL

Pemurnian dan identifikasi peptida utama dalam fraksi anti darah tinggi

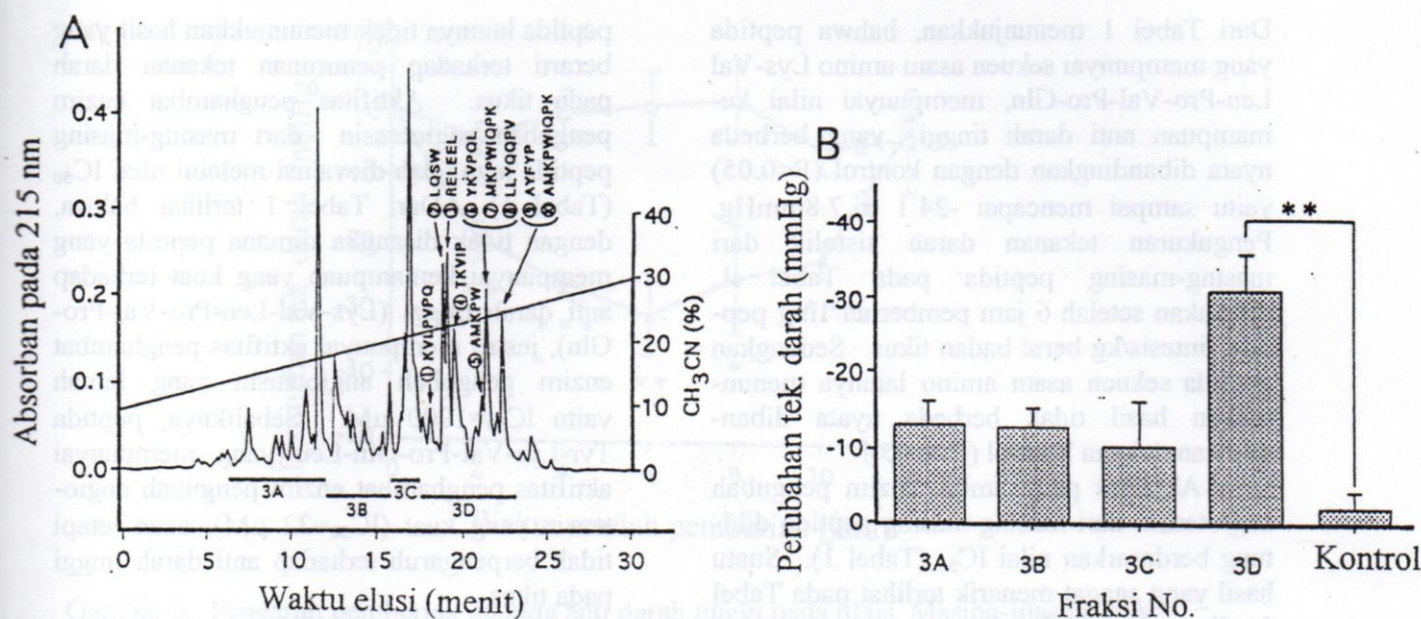
Identifikasi peptida anti darah tinggi dilakukan dengan cara menyuntikkan 10mg hidrolisat kasein kedalam kromatografi cairan dan hasil analisisnya dapat dibagi ke dalam 6 fraksi (fraksi 1 - 6) seperti yang diperlihatkan pada Gb.1A. Penyuntikan ini dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali, dan masing-masing fraksi tersebut ditampung secukupnya. Hasil tumpukan fraksi tersebut diberikan kepada tikus percobaan dan aktivitas anti darah tinggi dari masing-masing fraksi tersebut diukur setelah 6 jam pembe-

rian sampel kepada tikus. Perbedaan aktivitas anti darah tinggi dari masing-masing fraksi tersebut dapat dilihat pada Gb.1B. Dari Gb.1B terlihat bahwa hanya fraksi no.3 yang dapat menunjukkan aktifitas anti darah tinggi yang cukup kuat ($P < 0.001$).

Selanjutnya dengan cara yang sama seperti yang telah dilakukan sebelumnya yaitu dengan menyuntikkan 20mg peptida fraksi no.3 dari Gb.1B kedalam kromatografi cairan, dan hasil analisisnya diperlihatkan pada Gb.2A. Dari elektroprogram yang terlihat pada Gb.2A dapat dibagi kedalam 4 fraksi yaitu 3A, 3B, 3C dan 3D, dan selanjutnya fraksi tersebut masih diberikan kepada tikus untuk melihat kemampuan masing-masing anti darah tingginya. Kemampuan anti darah tinggi dari masing-masing fraksi tersebut dapat dilihat pada Gb.2B yang menunjukkan bahwa hanya fraksi 3D yang memperlihatkan mempunyai kemampuan yang tinggi terhadap anti darah tinggi.



Gambar 1. Analisis pendahuluan peptida dari hidrolisat kasein; A) Fraksi yang muncul setelah analisis dengan kromatografi cairan dan B) Aktifitas anti darah tinggi dari masing-masing fraksi setelah diberikan kepada tikus, yang diperlihatkan dengan perubahan tekanan darah sistolik (SBP=systolic blood pressure).



Gambar 2. Fraksinasi dan pengujian fraksi-fraksi dari fraksi no.3 pada gambar 1B;
 A) Fraksi baru yang muncul setelah di analisis dengan HPLC dan B) Aktivitas anti darah tinggi dari masing-masing fraksi yang ditunjukkan dengan perubahan terhadap tekanan darah sistolik.

Fraksi 3D pada Gb.2 masih dilakukan analisis lagi dengan menggunakan kromatografi cairan dan hasilnya diperoleh 10 fraksi peptida (data tidak diperlihatkan) yang selanjutnya dimurnikan dan diteruskan dengan penentuan analisis sekuen asam amino dari masing-masing fraksi tersebut dan

hasil analisis tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa ada 4 buah sekuen peptida berasal dari β -kasein, 4 buah sekuen peptida berasal dari α_{s2} -kasein, dan 2 buah sekuen sisanya ditemukan dalam α_{s1} -kasein.

Tabel 1. Aktivitas penghambat enzim pengubah angiotensin dan anti darah tinggi dari peptida sintesis

Sekuen	Asal ¹	Tekanan darah sistolik (mmHg)		IC ₅₀ ²
		X	SE	
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	β :169-175	-24.1*	7.7	1000
Leu-Gln-Ser-Trp	β :140-143	-1.6	3.4	500
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu	β :1-6	1.3	3.0	>1000
Thr-Lys-Val-Ile-Pro	α_{s2} :198-202	-9.2	2.7	400
Ala-Met-Lys-Pro-Trp	α_{s2} :189-192	-4.6	5.8	580
Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu	α_{s1} :104-109	-12.5	5.2	22
Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys	α_{s2} :190-197	-2.9	5.9	300
Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val	β :191-197	1.2	4.4	>1000
Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro	α_{s1} :143-147	-4.3	3.3	>1000
Ala-Met-Lys-Pro-TRp-Ile-Gln-Pro-Lys	α_{s2} :189-197	-0.6	4.2	600

¹Posisi asal sekuen asam amino dalam struktur asam amino kasein

²konsetrasi peptida yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas enzim pengubah angiotensin

*berbeda dari kontrol (P<0,05)

Dari Tabel 1 menunjukkan, bahwa peptida yang mempunyai sekuen asam amino Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, mempunyai nilai kemampuan anti darah tinggi yang berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.05$) yaitu sampai mencapai $-24.1 \pm 7.8 \text{ mmHg}$. Pengukuran tekanan darah sistolik dari masing-masing peptida pada Tabel 1, dilakukan setelah 6 jam pemberian 1mg peptida sintesis/kg berat badan tikus. Sedangkan peptida sekuen asam amino lainnya menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol ($P > 0.05$).

Aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin dari masing-masing peptida dihitung berdasarkan nilai IC_{50} (Tabel 1). Suatu hasil yang sangat menarik terlihat pada Tabel 1 dimana peptida dengan sekuen asama amino Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln yang mempunyai kemampuan anti darah tinggi sangat kuat, justru mempunyai aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin ($IC_{50} = 1000 \mu\text{M}$) sangat lemah. Sebaliknya peptida yang mempunyai sekuen asam amino Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu, mempunyai aktivitas menghambat enzim pengubah angiotensin yang kuat ($IC_{50} = 22 \mu\text{M}$), justru sebaliknya mempunyai kemampuan anti darah tinggi yang lemah.

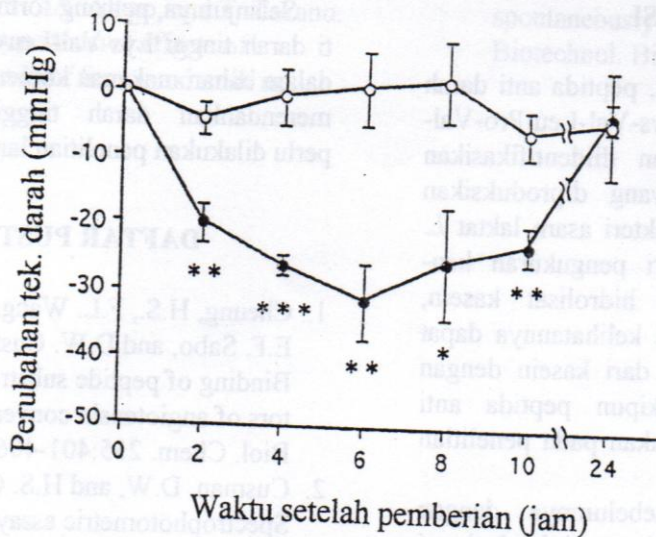
Peptida yang mempunyai aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin dan pengaruh anti darah tinggi

Kemampuan anti darah tinggi dari masing-masing peptida pada Tabel 1, telah dievaluasi dengan mengukur perubahan tekanan darah tikus pada 6 jam setelah pemberian sampel secara oral dengan dosis 1mg peptida sintesis/kg berat badan tikus. Hasil dari perlakuan tersebut terlihat bahwa peptida yang mempunyai pengaruh anti darah tinggi yang kuat adalah rantai peptida Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln dengan penurunan tekanan darah tikus sampai -24.1 mmHg . Sedangkan rantai

peptida lainnya tidak menunjukkan hasil yang berarti terhadap penurunan tekanan darah pada tikus. Aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin dari masing-masing peptida juga telah dievaluasi melalui nilai IC_{50} (Tabel 1). Dari Tabel 1 terlihat bahwa, dengan tidak disangka dimana peptida yang mempunyai kemampuan yang kuat terhadap anti darah tinggi (Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln), justru mempunyai aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin yang lemah yaitu $IC_{50} = 1000 \mu\text{M}$. Sebaliknya, peptida Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu yang mempunyai aktifitas penghambat enzim pengubah angiotensin yang kuat ($IC_{50} = 22 \mu\text{M}$), akan tetapi tidak berpengaruh terhadap anti darah tinggi pada tikus.

Perubahan tekanan darah setelah pemberian peptida

Pengukuran tekanan darah sistolik pada tikus diukur pada 0, 2, 4, 6, 8, 10 dan 24 jam setelah pemberian peptida anti darah tinggi Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, dan hasilnya tercantum pada Gb.3. Dari Gb.3 terlihat bahwa tidak ada perbedaan antara perubahan tekanan darah sistolik pada tikus kontrol dan tikus perlakuan setelah 24 jam pemberian sampel. Akan tetapi peptida Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln mempunyai potensial pengaruh anti darah tinggi pada tikus diukur pada 2, 4, 6, 8 dan 10 jam setelah pemberian sampel dengan dosis pemberian sampel sebesar 2mg peptida/kg berat badan, dimana angka penurunan darah berturut-turut sebagai berikut, 20.7 ± 2.9 , -26.3 ± 1.6 , -31.5 ± 5.6 , -25 ± 8.3 , dan $-22.7 \pm 2.8 \text{ mm Hg}$. Namun demikian, apabila dibandingkan penurunan tekanan darah pada tikus percobaan dengan tikus kontrol setelah tekanan darah diukur 24 jam kemudian, tidak menunjukkan perbedaan yang nyata yaitu $-2.9 \pm 2.4 \text{ mm Hg}$.



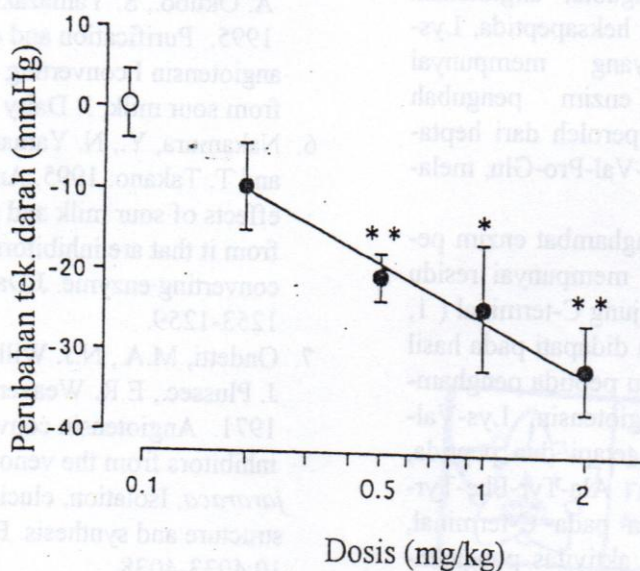
Gambar 3. Pengaruh pemberian peptida anti darah tinggi pada tikus. Masing-masing titik adalah nilai rata-rata perubahan tekanan darah sistolik dari 5 ulangan dan garis tegak lurus menunjukkan standar error.

(o) adalah kontrol; (●) adalah perlakuan; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ dan *** $P < 0.001$

Aktifitas peptida anti darah tinggi dengan perbedaan dosis

Pemberian peptida Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln dengan dosis yang berbeda kepada tikus, pengaruh anti darah tinggi diukur pada 6 jam setelah pemberian dan hasilnya tercantum pada Gb.4. Dari Gb.4 terlihat bahwa

pengaruh anti darah tinggi sangat tergantung pada dosis sampel yang diberikan, dalam hal ini kisaran dosis dari 0.2mg sampai dengan 2mg peptida/kg berat badan tikus. Akan tetapi pengaruh tersebut tidak berbeda nyata dengan tingkat pemberian dosis 0.2mg peptida/kg berat badan tikus.



Gambar 4. Pengaruh pemberian peptida Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln dengan dosis yang berbeda dari 0.2mg - 2mg/kg berat badan terhadap tekanan darah tikus.

(o) kontrol; (●) perlakuan; * $P < 0.05$ dan ** $P < 0.01$.

spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:776-782.

1994. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk

Biotechnol. Biochem. 58:776-782.

