

PERAN PEPTIDA SUSU SEBAGAI ANTIMIKROBA UNTUK MENINGKATKAN KESEHATAN

Eni Kusumaningtyas

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
enikusuma@yahoo.com

(Makalah masuk 9 Oktober 2012 – Diterima 3 Januari 2013)

ABSTRAK

Peptida antimikroba biasanya ada pada semua spesies sebagai bagian dari pertahanan sistem kekebalan nonspesifik untuk melawan infeksi. Peptida antimikroba yang diperoleh dari susu seperti isracidin, casocidin, casecidin dan beberapa fragmen lain dengan berbagai variasi sekuen asam amino dapat dihasilkan dengan proses hidrolisis enzimatik dari protein susu K-kasein, α -kasein, β -kasein, α -laktalbumin dan β -laktoglobulin. Peptida-peptida tersebut dapat dihasilkan oleh aktivitas protease dari saluran pencernaan atau mikroba, seperti tripsin, pepsin, kimosin atau alkalase. Cara kerja peptida-peptida tersebut adalah melalui interaksi muatan positif dengan muatan negatif pada membran sel target yang mengawali kerusakan fisiologis yang berhubungan dengan membran seperti pembelahan sel atau melalui perpindahan peptida melewati membran kemudian berinteraksi dengan sitoplasma target. Modifikasi muatan atau residu alifatik nonpolar pada peptida dapat meningkatkan atau mengurangi aktivitas peptida untuk melawan sejumlah strain mikroba dan nampaknya peningkatan atau pengurangan tersebut sangat tergantung pada strain yang digunakan. Beberapa peptida tidak hanya bertindak sebagai antimikroba tetapi dapat sekaligus sebagai penghambat *angiotensin-converting enzyme*, antioksidan, immunomodulator dan antiinflamasi maupun untuk pengawet makanan dan pakan. Walaupun produksi secara komersial masih terkendala dengan kurangnya teknologi untuk skala besar yang sesuai, cepatnya perkembangan metode untuk produksi peptida meningkatkan kemungkinan untuk produksi secara masal.

Kata kunci: Peptida, antimikroba, susu

ABSTRACT

THE ROLE OF MILK PEPTIDE AS ANTIMICROBIAL AGENT IN SUPPORTING HEALTH STATUS

Antimicrobial peptide is commonly present in all species as a component of their innate immune defense against infection. Antimicrobial peptides derived from milk such as isracidin, casocidin, casecidin and other fragments with variety of amino acid sequence are released upon enzymatic hydrolysis from milk protein K-casein, α -casein, β -casein, α -lactalbumin and β -lactoglobulin. These peptides were produced by the activity of digestive or microbial protease such as trypsin, pepsin, chymosin or alcalase. The mode of action of these peptides is by interaction of their positive with negative charge of target cell membrane leading to disruption of membrane associated with physiological event such as cell division or translocation of peptide across the membrane to interact with cytoplasmic target. Modification of charged or nonpolar aliphatic residues within peptides can enhance or reduce the activities of the peptides against a number of microbial strains and it seems to be strain dependent. Several peptides act not only as an antimicrobial but also as an angiotensin-converting enzyme inhibitor, antioxidant, immunomodulator, antiinflammation, food and feed preservative. Although the commercial production of these peptides is still limited due to lack of suitable large-scale technologies, fast development of some methods for peptide production will hopefully increase the possibility for mass production.

Key words: Peptide, antimicrobial, milk

PENDAHULUAN

Selama dua dekade terakhir, peptida dan fungsinya sebagai antimikroba menarik perhatian baik secara keilmuan maupun komersial terutama dengan munculnya resistensi bakteri terhadap antibiotika yang menuntut penemuan antimikroba baru yang lebih aman tanpa menimbulkan residu. Selain sebagai antimikroba, beberapa peptida dapat sekaligus berfungsi sebagai penghambat *angiotensin-converting enzyme*,

antioksidan, immunomodulator, antiinflamasi atau dapat diaplikasikan untuk pengawetan makanan atau pakan. Peptida seperti isracidin, casocidin, casecidin dan lactofericin B adalah beberapa peptida antimikroba yang telah dikenal dengan baik. Peptida-peptida tersebut ketika diberikan bersama-sama dapat mempunyai efek sinergi bahkan bersinergi juga dengan antibiotika atau obat-obatan yang lain.

Peptida semakin menarik sebagai pengganti antibiotika karena dinilai lebih aman karena

mempunyai mekanisme yang berbeda dengan antibiotika konvensional. Resistensi antibiotika diketahui dapat menimbulkan dampak yang besar dalam berbagai sektor kehidupan terutama dalam bidang kesehatan, ekonomi bahkan politik. Di Amerika, hanya satu bakteri saja yaitu *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicilin (MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus*) mampu membunuh lebih dari 19.000 orang per tahun. Angka tersebut melebihi angka kematian akibat emphysema, HIV/AIDS, dan penyakit Parkinson (Klevens et al. 2007). Sepsis dan pneumonia menimbulkan kematian sekitar 50.000 orang Amerika per tahun dan menghabiskan biaya lebih dari \$ 8 milyar pada tahun 2006 (Eber et al. 2010). Survei yang lebih baru menyebutkan bahwa hampir 50% pasien yang masuk ke ruang ICU dari 75 negara terkena infeksi mikroba dan pasien yang terinfeksi mempunyai risiko kematian dua kali lipat dibandingkan dengan pasien yang tidak terinfeksi (Vincent et al. 2009).

Selama dekade terakhir beberapa tipe antibiotika yang dikembangkan untuk keperluan klinis belum cukup untuk mengatasi laju kecepatan resistensi bakteri. Oleh karena itu, dicari alternatif pengganti antibiotika yang aman dan tidak menimbulkan efek samping yang merugikan, salah satunya adalah peptida antimikroba (*Antimicrobial peptides*: AMPs), baik yang tersedia secara natural maupun sintesis atau hasil hidrolisis enzimatis.

Dalam bidang pengawetan makanan telah dikembangkan penggunaan peptida dalam bentuk bubuk untuk pengawetan daging segar. Umuhumuza et al. (2011) mencoba mengaplikasikan peptida kasein dan laktoferrin dalam bentuk serbuk ke dalam daging babi segar. Daging babi diambil setelah 4-5 jam dipotong. Pengamatan dilakukan terhadap daging babi kontrol tanpa perlakuan dan daging yang diberi perlakuan dengan menaburkan serbuk peptida ke dalam daging yang disimpan pada suhu 4°C. Hasilnya menunjukkan bahwa pemberian serbuk peptida kasein atau laktoferrin dapat menurunkan jumlah mikroba dan meningkatkan *freshness index* selama penyimpanan.

Peptida hasil pemecahan protein akan mengalami perubahan karakteristik fisiko-kimia dari protein alamiahnya sebelum mengalami degradasi. Peptida tidak berasa atau pahit kecuali peptida yang mengandung glutamat atau asam aspartat yang berasa manis. Secara nutrisi, dalam bentuk peptida akan meningkatkan *bioavailability* asam amino dibandingkan dengan protein bahkan asam amino bebasnya. Peptida juga mempunyai berat molekul rendah sehingga kurang menimbulkan alergi dibandingkan dengan protein alamiahnya (Host dan Halken 2004).

Apabila dibandingkan dengan peptida antimikroba yang lain seperti defensin, potensi peptida dari kasein

sebagai antimikroba relatif lebih kecil karena *minimum inhibitory concentration* (MIC)-nya yang lebih rendah. Walaupun demikian, ketersediaan bahan baku karena konsentrasinya yang tinggi dalam susu dapat meningkatkan potensinya sebagai antimikroba maupun kemungkinan aplikasinya di lapangan.

Tulisan ini memaparkan tentang beberapa peptida antimikroba yang diperoleh dari protein susu, enzim yang biasa digunakan untuk hidrolisis protein susu, mekanisme kerja peptida antimikroba dan kemungkinan aplikasinya.

SUSU

Protein susu

Susu sapi merupakan sumber protein yang mengandung nilai biologis yang tinggi yang dicirikan dengan keseimbangan profil asam amino. Salah satu nilai nutrisi yang tinggi adalah protein susu dan degradasinya yang berupa peptida yang mempunyai fungsi biologis yang luas (Szajkowska et al. 2011). Sekuen protein susu tersebut mengandung fragmen dengan berbagai aktivitas seperti antihipertensi (Seppo et al. 2003), antibakteri (Atanasova dan Ivanova 2010) antithrombotic, opioid antagonis, immunomodulator, antifungi, mencegah amnesia, dan menyebabkan kontraksi otot polos (Szajkowska et al. 2011).

Protein dalam susu dapat dibagi dalam dua kategori yaitu protein tidak larut dari kelompok kasein dan protein terlarut (protein *whey*), yang dapat dijumpai dalam laktoserum. Kelompok kasein terdiri dari beberapa tipe yaitu: α S₁-, α S₂-, β -, K- and γ -, sementara protein *whey* terdiri dari α -laktalbumin dan β -laktoglobulin. Susu juga mengandung protein minor yang penting seperti serum albumin, immunoglobulins, laktoferrin, transferrin, *calcium-binding protein*, prolaktin, *folate-binding protein* and protease-peptone. Beberapa jenis protein susu dan konsentrasinya dalam susu seperti terlihat pada Tabel 1.

Keempat tipe kasein yaitu α S₁-, α S₂-, β -, and K-kasein terfosforilasi pada residu seril spesifik dan pada K-kasein terglisosilasi. K-kasein dapat terhidrolisis oleh enzim chymosin antara Phe 105 dan Met 106 menghasilkan dua polipeptida yaitu bagian hidrofobik N-terminal para-K-kaseinpolipeptida K-kasein (residues 1 to 105) dan bagian hidrofilik terfosforilasi serta C-terminal polipeptida terglisosilasi K-kasein (106-169) yang dikenal sebagai kaseinmakropeptida (CMP). Peptida CMP bersifat heterogen dan mengandung sisi modifikasi posttranslasi (glisosilasi dan fosforilasi) dari K-kasein. Ada 6 sisi potensial terjadinya glisosilasi yang teridentifikasi dalam CMP dan 5 *carbohydrate moieties* yang terikat pada masing-masing sisi. Tiga varian genetik CMP pada susu sapi yang berasal dari precursor K-kasein yang telah

teridentifikasi yaitu K-kasein A, B dan E dan varian A dan B paling sering dijumpai dalam susu sapi (Malkoski 2001).

Tabel 1. Jenis protein susu dan perkiraan konsentrasinya dalam susu

Protein	Persentase dalam susu skim (%)
α -kasein	45-55
β -kasein	8-15
K-kasein	25-35
γ -kasein	3-7
α -laktalbumin	2-5
β -laktoglobulin	7-12
Albumin	0,7-1,3
Laktoferrin	0,2-0,8
Immunoglobulin	
IgG1	1-2
IgG2	0,2-0,5
IgM	0,1-0,2
IgA	0,05-0,1
Protease-peptone	2,6

Sumber: Bremel course note, University of Wisconsin (2013)

PEPTIDA ANTIMIKROBA

Peptida bioaktif merupakan fragmen spesifik dari protein yang mempunyai pengaruh positif terhadap beberapa fungsi dan kondisi tubuh terutama dalam hal kesehatan. Sebagian besar peptida bioaktif tersebut dapat diperoleh dari protein alamiahnya dengan cara hidrolisis enzimatik, pemecahan enzimatik oleh mikroorganisme melalui proses fermentasi atau melalui pemrosesan makanan seperti asam, basa atau pemanasan. Karakteristik peptida tersebut sangat ditentukan oleh susunan dan panjang asam amino dalam rantai peptida. Sifat asam-basa ditentukan oleh residu terminal bebas dan kelompok ion di bagian lateral dari residu dalam rantai. Reaktivitas dari gugus terminal tersebut berguna untuk deteksi dan kuantifikasi peptida bioaktif tersebut. Beberapa peptida mempunyai daerah rantai peptida yang *overlapping* yang menghasilkan fungsi yang berbeda. Daerah tersebut diduga sebagai "*strategic zone*" yang sebagian terlindungi dari pemecahan lebih lanjut oleh enzim proteolitik. Salah satu contoh "*strategic zone*" adalah sekuen 60-70 dari β -kasein sapi dan manusia. Sekuen tersebut terlindungi dari proteolisis karena hidrofobitasnya yang tinggi dan kehadiran residu prolin. Asam amino prolin dapat berfungsi untuk membantu mempertahankan rigiditas formasi peptida

(Tidona et al. 2009) melalui kemampuannya untuk mempertahankan sudut torsi tertentu pada rantai peptida sehingga peptida tidak mudah mengalami kerusakan. Hidrofobitas yang tinggi dan residu prolin (jika ada) tersebut yang juga melindungi peptida tersebut dari pemecahan lebih lanjut ketika kontak dengan enzim protease maupun asam dalam saluran pencernaan.

Peptida hasil hidrolisis protein susu dengan enzim pencernaan

Pemecahan protein susu menjadi peptida bioaktif secara normal terjadi selama proses pencernaan oleh pepsin dan enzim pankreas seperti tripsin, kimotripsin, karboksi dan aminopeptidase yang menghasilkan fragmen peptida bioaktif dalam saluran pencernaan individu yang mengkonsumsi susu. Pengaruh fisiologi peptida bioaktif sangat tergantung pada kemampuannya untuk mencapai target, termasuk absorpsi melalui sel epitelium untuk organ perifer. Beberapa peptida dari susu yang bersifat antimikroba yang diperoleh secara *in vitro* melalui proses inkubasi dengan enzim seperti pepsin, kimotripsin, alkalase dan pankreatin atau kombinasinya serta enzim dari beberapa bakteri dan fungi.

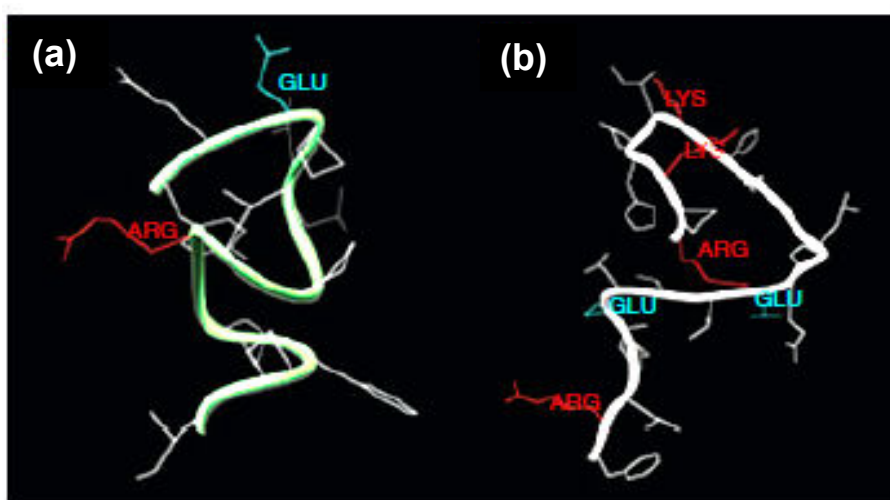
Peptida bioaktif derivat dari protein susu biasanya berupa fragmen yang mengandung 3-20 residu asam amino. Contoh struktur tersier peptida hasil hidrolisis enzimatik protein susu, casecin dan isracidin, yang mempunyai kemampuan antimikroba seperti terlihat pada Gambar 1.

Berikut ini beberapa peptida yang diperoleh dari hasil pemecahan protein susu yang berfungsi sebagai antimikroba.

K-KASEIN

Kaseinmakropeptida (CMP) fragmen 138-158

Residu CMP fragmen 106-169 merupakan fragmen *heterogenous C* terminal dari kasein susu sapi tersusun dari bentuk terglisosilasi dan terfosforilasi dari variasi genetik yang berbeda. Proses enzimatik residu 106-169 dengan menggunakan endoproteinase Glu-C menghasilkan 12 fraksi yang terdiri dari 11 fraksi terglisosilasi yang menunjukkan sedikit hambatan terhadap pertumbuhan *S. mutan*. Peptida hasil hidrolisis dipisahkan menggunakan RP-HPLC dan gel filtration-HPLC. Satu fraksi mengandung peptida yang tidak terglisosilasi pada residu Ser(P)149 K-kasein-A(138-158) (AVESTVATLEDSPEVIESPPE) menunjukkan daya hambat dengan MIC 59 $\mu\text{g/ml}$. Namun ketika peptida tersebut disintesis tanpa terjadinya fosforilasi ternyata tidak menunjukkan



Gambar 1. Struktur tersier caseicin 15 (a) dan isracidin (b). Muatan positif ditandai dengan warna merah, sedangkan muatan negatif ditandai dengan warna biru

Sumber: Petterson et al. (2004)

adanya hambatan pertumbuhan terhadap bakteri *S. mutan*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fosforilasi sangat penting untuk aktivitas peptida tersebut (Malkoski et al. 2001).

N-terminal region κ -kasein fragmen (106-124)

Fragmen (106-124) tersebut masih dalam bagian CMP. Salah satu yang menarik adalah peptida hasil pemecahan CMP tersebut yang sudah diteliti adalah kemampuan peptida tersebut untuk membunuh bakteri patogen seperti *E. coli* tetapi melindungi bakteri baik seperti *Lactobacillus rhamnosus* pada kondisi asam. Penelitian yang dilakukan menggunakan CMP susu sapi dan susu kambing yang diinkubasi menggunakan enzim pepsin menunjukkan bahwa pada dosis 0,25 mg/ml populasi *E. coli* menurun hingga 90% dalam waktu 15 menit. Aktivitas tersebut tidak terpengaruh dengan penambahan susu sapi atau glikokonjugat yang terikat pada CMP. Sebaliknya, penambahan CMP dapat meningkatkan viabilitas *L. rhamnosus* sampai 50% setelah inkubasi selama 60 menit pada pH 3 dibandingkan dengan kontrol yang ditumbuhkan pada media tanpa CMP yang hanya mencapai viabilitas 5% (Robitaille et al. 2012).

Fragmen (18-24), fragmen(30-32) dan fragmen(139-146)

Fragmen K-kasein tersebut diperoleh dari hasil digesti kasein menggunakan enzim pepsin. Hasil digesti pertama dipisahkan dengan semipreparatif *high-performance liquid chromatography* (HPLC),

kemudian fraksi diuji dengan *E. coli* ATCC 25922 dan *Listeria innocua* CECT 910T. Selanjutnya fraksi yang aktif dimurnikan lagi dengan kromatografi tahap kedua. Identifikasi dilakukan untuk melihat peptida yang aktif dengan menggunakan *online dan offline HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry* dan diperoleh 21 fraksi aktif, sebagian besar dari K-kasein, sementara fraksi lain terdiri dari α dan β -kasein. Dari fraksi yang diperoleh, tiga diantaranya yang paling aktif menghambat bakteri uji yaitu fragmen (18-24), fragmen (30-32) dan fragmen (139-146) yang efektif terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan *L. innocua* CECT 910T (Lopez-Exposito et al. 2006).

K-kasein (fragmen 109-137)

K-kasein (fragmen 109-137) merupakan peptida hasil hidrolisis dengan kimosin. Peptida tersebut diketahui dapat menghambat aktivitas proteolitik *P. gingivalis* dan bersinergi dengan Zn (II) untuk menghambat Arg dan *Lys-specific proteinase*. Preinkubasi *P. gingivalis* dengan 500 μ M K-kasein (fragmen 109-137) secara signifikan mengurangi perkembangan lesi pada infeksi pada mencit (Toh et al. 2011). Berdasarkan analisis prediksi struktur K-kasein (fragmen 109-137) kemungkinan berbentuk α -helix turn K-helix conformation. Studi *Circular Dichroism* dan *Nuclear Magnetic Resonance* mengindikasikan bahwa pada daerah peptida tersebut hanya berbentuk *random coil*. Walaupun demikian, pada kenyataannya peptida mungkin membentuk struktur sekunder pada kondisi yang sesuai terutama saat berikatan dengan protein lain.

α -S₁-KASEIN**Isracidin (fragmen 1-23; fragmen16-38)**

Isracidin (fragmen 1-23) diperoleh dari hasil digesti α -S₁-kasein oleh kimosin yang efektif secara *in vivo* pada mencit terhadap bakteri *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*. Isracidin juga bersifat sinergi dengan antibiotik untuk melawan strain *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotika ketika dikombinasikan dengan penisilin atau streptomycin (Lahov dan Regelson 1996). Kasein dihidrolisis oleh kimosin pertama pada daerah K-kasein pada Phe₁₀₅-Met₁₀₆ menjadi 2 fragmen para-K-kasein (fragmen 1-105) dan makropeptida (fragmen 106-169). Isracidin merupakan peptida ketiga yang dihasilkan dari hidrolisis kimosin pada α -S₁-kasein B dan terdiri dari fragmen (1-23). Penelitian secara *in vivo* menunjukkan bahwa isracidin yang diinjeksikan secara *intramuscular* (IM) pada praperlakuan dengan bakteri uji memberikan proteksi terhadap mencit dari infeksi letal (Tabel 2).

Penelitian lapang juga menunjukkan bahwa injeksi isracidin memberikan proteksi domba dan sapi dari mastitis. Perlindungan terhadap mencit dari infeksi *Candida albicans* oleh isracidin terjadi melalui stimulasi respon imunitas dan meningkatkan kemampuan fagositosis. Kajian toksikologi menunjukkan bahwa isracidin tidak menimbulkan efek samping. Penelitian dilakukan dengan memberikan dosis intra muskular insracidin 2 g/kg bobot badan pada kelinci. Tidak ada *immediate* atau reaksi *delayed*

hypersensitivity ataupun *shock anaphylactic* pada kelinci, bahkan ketika penyuntikan diulang lagi selama satu bulan (Lahov dan Regelson 1996).

Sementara itu, Birkemo et al. (2009) juga melaporkan fragmen isracidin meskipun berbeda letak asam aminonya yaitu pada fragmen 16-38 juga diberi nama Isracidin. Fragmen 16-38 mempunyai rantai asam amino RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF dengan berat molekul 2763,80 Da. Isracidin merupakan peptida (fragmen 16-38) dari α -S₁-kasein B sapi. Isracidin secara aktif dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan MIC 0,2 mg/ml untuk *E. coli* DH5a dan DPC6053serta menghambat *Enterobacter sakazakii* dengan MIC 0,5 mg/ml.

Cp1 (fragmen 99-109)

Peptida lain yang diperoleh oleh McCann et al. (2006) adalah hasil hidrolisis kasein dengan pepsin, tripsin, α -kimotripsin dan β -kimotripsin. Hidrolisis dilakukan pada suhu 37°C selama 4 jam dan diuji kemampuan antibakteri dengan menggunakan *Bacillus subtilis* dan *Listeria innocua*. Hanya hidrolisat pepsin yang menunjukkan kemampuan antibakteri yang selanjutnya dimurnikan dengan menggunakan *reverse phase*-HPLC dan dikarakterisasi dengan *electrospray ionisation mass spectrometry*. Peptida aktif diketahui sebagai Cp1 (fragmen 99-109) dari α -S₁-kasein sapi, berat molekul 1386 Da dengan rantai peptida LRLKKYKVPQL dan PI teoritis 10,46. Cp1 aktif terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif.

Tabel 2. Pengaruh praperlakuan dengan isracidin pada mencit yang diinfeksi dengan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*

Bakteri uji	Dosis Isracidin (I.M)	Jumlah bakteri untuk ujiantang	Persentase kematian mencit (%)	
			Praperlakuan dengan Isracidin	Kontrol tanpa isracidin
<i>S. aureus</i>				
Strain 8126	500 μ g	2 x 10 ⁸	5,0	95
	100 μ g		5,0	95
	50 μ g		5,0	95
Strain S20T	1 mg	2 x 10 ⁸	28,0	83
Strain Smith	1 mg	2 x 10 ⁸	2,0	83
	500 μ g		2,6	60
	100 μ g		3,8	70
	1 μ g		8,6	82
	0,1 μ g		10,0	70
<i>S. pyogenes</i>				
Strain M3	1 mg	2 x 10 ⁴	30,0	100
	1mg	2 x 10 ³	0	50

Sumber: Lahov dan Regelson (1996)

Residu dalam Cp1 dari α -S₁-kasein pada sapi identik dengan daerah α -S₁-kasein pada domba, kambing dan kerbau air. Perbedaannya hanya pada residu 105 α -S₁-kasein sapi mengandung lisin sementara domba, kambing dan kerbau air mempunyai residu asparagin. Kemiripan pada residu 99-109 α -S₁-kasein pada ketiga spesies tersebut dengan sapi memungkinkan untuk diperoleh peptida yang mempunyai aktivitas antimikroba dan daerah pemotongan pepsin yang sama (McCann et al. 2006).

α -S₂-KASEIN

Casocidin-I (fragmen 165-203)

Casocidin-I (fragmen 165-203) diperoleh dari hasil hidrolisis dengan tripsin dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *Staphylococcus carnosus*. Peptida tersebut mempunyai berat molekul 4870 Da. N-terminal lisin terletak pada daerah motif basa lisin dalam molekul prekursor. Titik isoelektrik untuk peptida tersebut terhitung 8,9 dan plot hidrofobisitas menunjukkan perubahan teratur dari residu hidrofobik dan hidrofilik. Pola tersebut memunculkan hipotesis bahwa mekanisme peptida tersebut mirip dengan *amphiphatic defensin permeabilizing bacterial membrane*. Kasein α -S₂ tidak ditemukan pada air susu ibu (ASI) sehingga casocidin-1 berhubungan dengan susu sapi dan kemungkinan mempunyai pengaruh terhadap mikroflora usus pada manusia (Zacht et al. 1995).

Fragmen Cr

Sementara itu, McCann et al. (2005) melaporkan peptida hasil hidrolisis *sodium caseinate* dengan

kimosin menghasilkan lima peptida antibakteri dari α -S₂-kasein sapi yaitu: Cr1 (f181-207), Cr2 (f180-207), Cr3 (f175-207), Cr4 (f164-207) dan Cr5 (f172-207). Peptida Cr1, Cr4 dan Cr5 menunjukkan daya hambat terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan aktivitas yang hampir sama dengan peptida bacteriocin, nisin dan peptida antibakteri, laktoferricin B. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3. Peptida Cr1, Cr4 dan Cr5 tersebut tetap aktif dengan pemanasan 121°C selama 15 menit yang menandakan bahwa peptida tersebut tahan panas. Stabilitas terhadap panas tersebut lebih tinggi daripada Pediocin PO₂ (peptida bacteriocin yang hidrofobik) yang tahan terhadap pemanasan 100°C selama 15 menit.

Fragmen (183-207) dan fragmen (164-179)

Fragmen (183-207) dan fragmen (164-179) diperoleh melalui hidrolisis α -S₂-kasein dengan enzim pepsin. Setelah fraksinasi dengan *cation-exchange chromatography* kemudian dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan *high-performance liquid chromatography* sehingga diperoleh dua fraksi aktif yaitu fragmen (183-207) dan fragmen(164-179) sebagai antibakteri dengan MIC 8-99 μ M tergantung pada strain bakterinya. Peptida fragmen (183-207) mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan fragmen (164-179) (Recio dan Visser 1999).

Fragmen yang sama diisolasi oleh McCann et al. (2006) yang merupakan fraksinasi hidrolisat kasein hasil hidrolisis dengan pepsin. Fraksinasi dilakukan dengan *reverse phase-HPLC* dan dikarakterisasi menggunakan *electrospray ionization mass spectrophotometry*. Peptida yang diperoleh diketahui aktif terhadap *Listeria innocua* yang teridentifikasi sebagai Cp2 (fragmen 183-207) dengan berat

Tabel 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) peptida antibakteri hasil hidrolisis α -S₂-kasein dengan kimosin terhadap bakteri terseleksi yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 jam

Kultur bakteri	MIC (μ g/mL)				
	Cr1	Cr4	Cr5	Lactoferricin B	Nisin
<i>Bacillus cereus</i>	>84	-	-	400	6,3
<i>Bacillus subtilis</i>	21	10,7	4,8	6,3	7,8
<i>Listeria innocua</i>	21	10,7	4,8	6,3	3,9
<i>Listeria monocytogenes 2310</i>	21	10,7	4,8	6,3	3,9
<i>Listeria monocytogenes 2325</i>	-	-	-	6,3	3,9
<i>Escherichia coli</i>	>168	>171,2	>76,5	12,5	400
<i>Salmonella enteritidis</i>	>84	-	-	25	200
<i>Salmonella salford</i>	-	-	-	-6,3	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	21	21,4	-	-	50

- : tidak diujikan

Sumber: McCann et al. (2005)

molekul 3116 Da dengan rantai peptida VYQHQAAMKWPQPKTKVIPYVRYL dan PI teoritis 10,12.

Lopez-Exposito et al. (2008) juga melakukan hidrolisis α -S₂-kasein menggunakan pepsin pada pH 3,0 pada suhu 37°C dengan variasi waktu untuk menghasilkan peptida antimikroba terhadap *E. coli*. Uji dilakukan dengan mereaksikan 2 mg/ml hidrolisat dengan *E. coli* 1-4 x 10⁶ CFU/ml. Potensi paling tinggi ditunjukkan oleh hidrolisat α -S₂-kasein dengan waktu hidrolisis selama 30 menit. Hidrolisat juga secara aktif dapat menghambat *L. innocua* sebesar 3 log pada konsentrasi yang sama.

β -KASEIN

Casecidin 17 (fragmen193-209)

Peptida tersebut diisolasi dari kolostrum dengan kandungan lebih kurang 30 µg/ml dan terletak pada bagian C-terminal kasein sapi (YQEPVLPVVRGPFPIIV) dengan massa molekul 1881 Da. Casecidin 17 mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* DH5a dengan MIC 0,5 mg/ml dan 0,4 mg/ml terhadap *E. coli* DPC6053 (Birkemo et al. 2008).

Casecidin 15

Casecidin 15 juga diperoleh dari kolostrum sapi dengan kandungan lebih kurang 12 µg/ml dan terletak pada bagian C-terminal kasein sapi dengan rantai peptida YQEPVLPVVRGPFPI dan berat molekul 1669,06 Da. Tidak jauh berbeda dengan casecidin 17, casecidin 15 juga aktif terhadap *E. coli* DH5a dan DPC6053 dengan MIC 0,4 mg/ml. Karena kesamaan aktivitas biologi tersebut memungkinkan casecidin 17 dan casecidin 15 mempunyai prediksi struktur tersier yang mirip satu sama lain (Birkemo et al. 2008). Perbandingan aktivitas antimikroba antara casecidin 17, 15, isracidin dan pleurocidin sebagai kontrol positif seperti terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Minimum inhibitory concentration (MIC, mg/ml) dari isracidin, casecidin 15, casecidin 17 dan kontrol positif pleurocidin terhadap *Escherichia coli* DH5a, *Escherichia coli* DPC6053 dan *Enterobacter sakazakii* DPC5120

Bakteri uji	MIC (mg/mL)*			
	Isracidin	Casecidin 15	Casecidin 17	Pleurocidin
<i>E. coli</i> DH5a	0,2	0,5	0,5	0,001
<i>E. coli</i> DPC6053	0,2	0,4	0,4	0,001
<i>E. sakazakii</i> DPC5120	0,2	>1	>1	0,008

*Konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan sebesar 50%

Sumber: Birkemo et al. (2008)

α -laktalbumin

Hidrolis α -laktalbumin dengan tripsin dan kimotripsin menghasilkan tiga fragmen polipeptida yang bersifat antibakteri. Hidrolisis dengan tripsin menghasilkan EQLTK (residu 1-5) dan GYGGVSLPEWVCTTF ALCSEK (residu 17-31) S-S (109-114) yang terdiri dari dua polipeptida yang dihubungkan oleh jembatan disulfida. Sedangkan digesti dengan kimotripsin menghasilkan peptida CKDDQNPV ISCDKF (residu 61-68) S-S (75-80) yang juga merupakan gabungan dua polipeptida yang dihubungkan dengan jembatan disulfida. Ketiga polipeptida aktif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan hanya sedikit menghambat bakteri Gram negatif (Pellegrini et al. 1999).

β -laktoglobulin

Hidrolisis tripsin terhadap β -laktoglobulin menghasilkan empat fragmen peptida yang bersifat antibakteri. Rantai peptida tersebut adalah VAGTWY (fragmen 15-20), AASDISLLDAQSAPLR (fragmen 25-40), IPAVFK (fragmen 78-83) and VLVLDTDYK (fragmen 92-100). Keempat peptida tersebut secara aktif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Modifikasi terhadap peptida tersebut dengan mengganti Asp (98) menjadi Arg dan menambah residu lisin pada C terminal sehingga menjadi VLVLDTRYKK dapat meningkatkan aktivitasnya sehingga juga aktif menghambat bakteri Gram negatif yaitu *E. coli* dan *Bordetella bronchiseptica* tetapi mengurangi kemampuannya terhadap *Bacillus subtilis* (Pellegrini et al. 2001).

Laktoferrin

Hidrolisis laktoferrin sapi dengan pepsin menghasilkan peptida Lfcin B (fragmen 17-31) yang secara aktif menghambat *E. coli* dan *S. aureus* dan paling efisien terhadap *E. coli*. Apabila dilihat dari konsentrasi dan waktu inkubasi tampaknya tidak

berpengaruh pada kemampuan antimikrobanya (Ulvatne dan Vorland 2001). Laktoferrisin yang dihasilkan tersebut juga dapat bersinergi dengan antibiotika untuk membunuh mikroba. Laktoferrisin B dapat bersinergi dengan *erythromycin* untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* dan sedikit terjadi sinergisme dengan *penicillin G*, *vancomycin* dan *gentamicin* terhadap *E. coli*. Untuk kemampuannya terhadap *S. aureus*, laktoferrisin B sedikit bersinergi dengan *penicillin G* tetapi bersifat antagonis dengan *vancomycin* dan *gentamicin* untuk menghambat *S. aureus* pada konsentrasi yang rendah. Sinergisme terjadi diduga bahwa laktoferrisin B memfasilitasi *uptake* antibiotika masuk ke dalam membran sel (Vorland et al. 1999).

HIDROLISIS DENGAN ENZIM YANG DIHASILKAN MIKROBA

Selain hidrolisis dengan enzim pencernaan, beberapa peptida bioaktif dari susu juga diperoleh dari fermentasi atau hasil hidrolisis dari enzim mikroba. Beberapa hasil hidrolisis *sodium kaseinate* yang dihasilkan dari aktivitas mikroba adalah:

Hidrolisis kasein sapi dengan protease *Lactobacillus acidophilus*

Fermentasi sodium kaseinate oleh *L. acidophilus* menghasilkan peptida dari α -S₁-kasein yaitu caseicin A fragmen (21-29), caseicin B fragmen(30-38), dan

caseicin fragmen C (195-208) yang teridentifikasi berturut-turut IKHQGLPQE, VLNENLLR, dan SDIPNPIGSENSEK. Peptida tersebut diperoleh dengan menginokulasikan *L. acidophilus* DPC6026 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pH konstan 7. Fraksi dipurifikasi menggunakan *reverse-phase* HPLC dan diidentifikasi dengan MALDI-TOF. Sekuen asam amino caseicin A mempunyai homologi dengan isracidin (fragmen 6-14), sementara caseicin B mempunyai kesamaan dengan isracidin pada 8 residu bagian terminal C (residu 15-23) (Hayes et al. 2006). Hasil uji aktivitas antimikroba dari ketiga peptida tersebut seperti terlihat pada Tabel 5.

Apabila dibandingkan dengan isracidin (sebagai kontrol positif), caseicin A dan B tidak efektif terhadap bakteri *S. aureus*, walaupun isracidin yang juga merupakan derivat α -S₁ kasein yang mempunyai sekuen homolog dengan caseicin A dan B, aktif menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Hal tersebut terjadi diduga karena konsentrasi peptida yang digunakan pada uji isracidin pada penelitian *in vivo* pada domba menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 1 mg/ml (Lahov dan Regelson 1996). Kemungkinan kedua, pada caseicin A, B dan C kekurangan asam amino terminal N dengan rantai asam amino RPKHP (isracidin fragmen (1-5) yang mungkin bertanggungjawab pada aktivitasnya terhadap *S. aureus* (Hayes et al. 2006).

Hayes et al. (2009) melaporkan lanjutan dari penelitian sebelumnya tentang caseicin A dan caseicin B yang diperoleh dari hasil fermentasi sodium kaseinate dengan *Lactobacillus acidophilus*. Studi

Tabel 5. Spektrum daya hambat peptida murni yang disintesis melalui fermentasi sodium kaseinate oleh *Lactobacillus acidophilus*

Bakteri uji	Daya hambat peptida*					
	Sekuens dan fragmen Caseicin			Isracidin	Cecropin P1	Indolicidin
	IKHQGLPQ E α _{s1} -CN f(21-29)	VLNENL LR α _{s1} -CN f(30-38)	SDIPNPI G SENSEK α _{s1} -CN f(195-208)			
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-/+	+++	-
<i>E. coli</i> JM109	+++	+++	-	+++	+++	-
<i>E. coli</i> O157:H7 DPC6054	+++	+++	-	-	+++	-
<i>E. coli</i> O157:H7 DPC6055	+++	+++	-	+++	+++	-
<i>E. sakazakii</i> ATCC12868	+++	+++	-	+++	+++	-
<i>E. sakazakii</i> NTCC 8155	+++	+++	-	+++	+++	-
<i>L. innocua</i>	++	++	+	++	++	+
<i>L. burgaricus</i> ATCC 11842	+++	+++	-	++	++	+
<i>S. mutans</i>	++	++	-	++	++	+

*Diameter zona hambat: +++: 1,5 cm <diameter \leq 2,0 cm; ++: 1,0 <diameter \leq 1,5 cm; +: 0,5 cm <diameter \leq 1,0 cm; -/+ : diameter <0,5 cm; - tidak ada zona

Sumber: Hayes et al. (2006)

tersebut mengevaluasi kemampuan peptida untuk membunuh *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 yang di"spike" (diinokulasikan sehingga jumlahnya lebih banyak) pada susu formula untuk bayi. Hasilnya menunjukkan bahwa pada susu yang mengandung peptida hasil fermentasi *sodium* kaseinate tersebut (0,21% (w/v) mengalami penurunan jumlah patogen lebih dari 4 log CFU/ml ketika diinkubasi pada suhu 37°C. Ketika hasil fermentasi *Lactobacillus acidophilus* (6,7% (w/v) tersebut ditambahkan pada susu formula bayi yang dipasteurisasi dan diinokulasi dengan 6 log CFU/ml dengan *E. sakazakii* menunjukkan bahwa jumlah mikroba tersebut tetap dalam waktu 4 jam sementara kontrol negatif menunjukkan kenaikan 100 kali lipat. Hasil fermentasi juga menunjukkan aktivitasnya untuk menghambat *E. coli* O157:H7 dan *Listeria innocua*.

Peptida hasil hidrolisis kasein sapi dengan *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis*

Penelitian lain yang juga menghasilkan peptida antimikroba dari hasil fermentasi kasein sapi dilakukan oleh Kent et al (2012). Mereka menginokulasikan secara terpisah 16 isolat *Bacillus* spp. pada sodium kaseinate (2,5%, w/v) dan diinkubasi selama semalam. Hasil pemecahan protein dianalisis menggunakan *gel permeation*-HPLC (GP-HPLC) peptida dipilih ukurannya menggunakan MALDI-TOF *mass spectrometry*. Caseicin A (IKHQGLPQE) dan caseicin B (VLNENLLR) yang diperoleh sebagai hasil fermentasi isolat *Bacillus cereus* dan *Bacillus thuringiensis* diuji kemampuan antimikrobanya setelah dipurifikasi dengan RP-HPLC dan menunjukkan daya hambat terhadap patogen pada susu formula, *Cronobacter sakazakii*.

Peptida dari fermentasi susu sapi dengan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Fermentasi susu menggunakan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dapat menghasilkan peptida antimikroba. Peptida diisolasi dari supernatan susu terfermentasi tersebut dan masing-masing mengandung 14 dan 15 asam amino. Isolasi dan purifikasi dilakukan dengan menggunakan gel filtrasi dan *reversed-phase* HPLC. Kedua peptida tersebut mempunyai aktivitas bakterisidal terhadap bakteri Gram positif maupun negatif (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* dan *E. coli*) dengan MIC antara 120-200 µg/ml. Peptida tersebut mengandung jumlah asam amino bermuatan positif yang lebih banyak menunjukkan potensinya sebagai antimikroba (Muralidhara et al. 2007).

MEKANISME KERJA PEPTIDA ANTIMIKROBA DARI PROTEIN SUSU

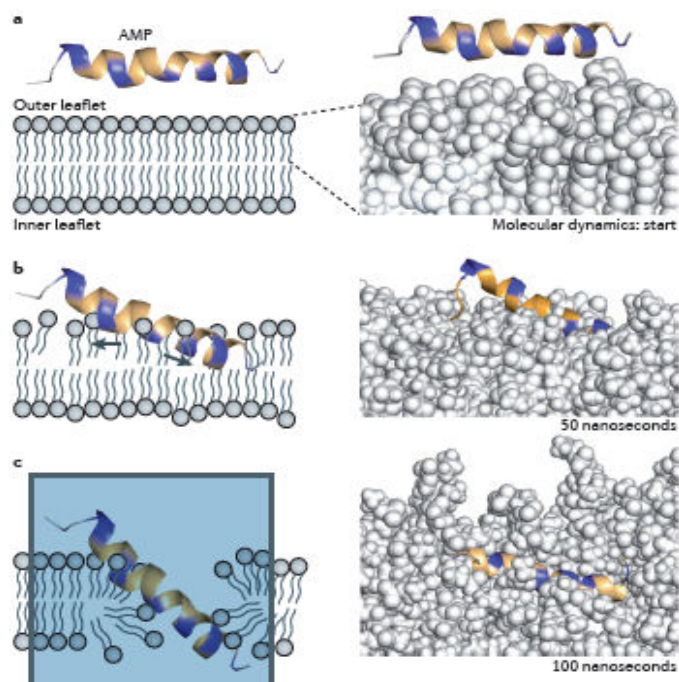
Untuk mendapatkan aktivitas antimikroba yang maksimal perlu diketahui mekanisme kerja peptida tersebut. Dalam rangka pemahaman terhadap mekanisme kerja tersebut ada beberapa hipotesis yang telah diungkapkan. Hal terpenting pertama adalah interaksi antara peptida dengan membran bakteri yang kemudian diikuti dengan kerusakan membran, gangguan fisiologi membran seperti biosintesis dinding sel, pembelahan sel atau translokasi melewati membran untuk berinteraksi dengan sitoplasma sel target (Gambar 2).

Secara umum diasumsikan bahwa kutub positif dari peptida berinteraksi dengan kutub negatif dari lipida pada permukaan luar ataupun membran sitoplasma. Selanjutnya peptida menyisip dengan orientasi posisi paralel pada *bilayer*, ke dalam membran sitoplasma yang kemudian mengakibatkan pelepasan lipida (Fjell et al. 2012).

Kemungkinan perubahan struktur membran meliputi penipisan, pembentukan pori perubahan "curvature", modifikasi elektrostatik dan *localized perturbation*, yang mungkin mengakibatkan reorientasi molekul peptida dalam membran. Selanjutnya peptida berpindah melalui membran, berdifusi ke dalam sitoplasma dan mencapai target intraseluler.

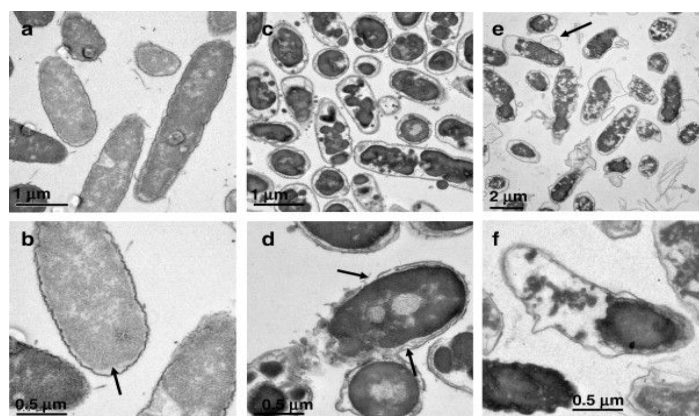
Peptida bioaktif yang diperoleh dari susu terutama yang berasal dari kasein bekerja dengan berbagai cara diantaranya adalah sebagai berikut: pada bakteri Gram positif, α -S₂-kasein (fragmen 183-207) melekat pada bagian *lipoteichoic acid*, membuat pori pada dinding sel selanjutnya menimbulkan kebocoran pada sitoplasma sehingga isinya keluar. Pada bakteri Gram negatif, peptida tersebut berikatan pada bagian lipopolisakarida, membuat pori pada membran luar kemudian menimbulkan kondensasi sitoplasma. Sementara itu, Laktoferrisin B juga menunjukkan pengaruh yang sama yaitu mengganggu permeabilitas membran luar dan membran dalam sel bakteri (Lopez-Exposito et al. 2008). Berikut ini hasil pengamatan menggunakan *transmission electron microscopy* (TEM) yang menggambarkan pengaruh peptida terhadap sel bakteri *E. coli* ATCC 25922 (Gambar 3 dan 4).

Untuk K-kasein (f109-137) peptida berikatan dengan kompleks substrat dengan kehadiran Zn (II). Zn (II) secara alamiah ada dalam lingkungan dan bergabung dengan residu His, Glu, Asp dan Cys dan mempunyai peranan penting dalam struktur dan/atau mekanisme katalitik protein. Dalam peranannya dengan K-kasein (f109-137), dipostulasikan bahwa terjadi "tembakan proton" ketika konsentrasi ion Zn (II) tinggi atau ketika Zn (II) distabilkan oleh interaksi dengan K-kasein (f109-137). Kehadiran Zn (II) atau ikatan dari



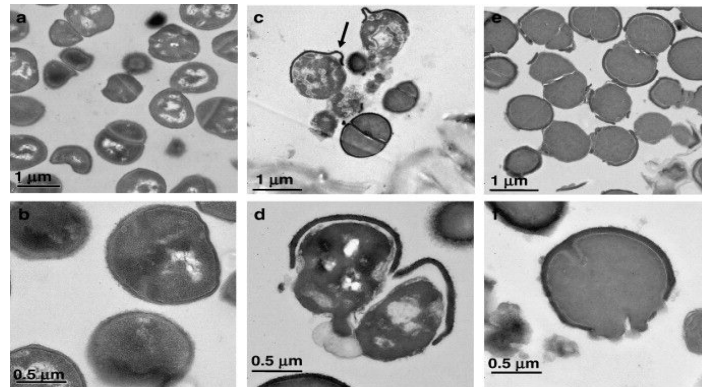
Gambar 2. Mekanisme kerusakan membran atau translokasi oleh peptida antimikroba. Peptida antimikroba (AMP) dengan bagian hidrofobik berwarna biru. Tahap pertama ditandai dengan pelekatan membran (a) dan insersi ke dalam membran luar (b). Tidak semua AMP menyisip ke dalam dan merusak membran c) atau membentuk pori. Beberapa peptida terlalu pendek untuk merentangkan *bilayer* sebagai contoh *cyclic decapeptide* gramicidin S. peptida pada konsentrasi tinggi memungkinkan untuk peningkatan pelengkungan membran dan memfasilitasi pembentukan pori atau translokasi melewati membran

Sumber: Fjell et al. (2012)



Gambar 3. Mikrograf TEM pada *Escherichia coli* ATCC 25922. (a) dan (b) kontrol negatif sel *E. coli* yang tidak diberi perlakuan; (c) dan (d) sel yang diberi perlakuan dengan α_{S2} -kasein sapi (fragmen 183-207) pada konsentrasi $31\mu\text{M}$ selama 2 jam pada suhu 37°C ; tanda panah (d) menunjukkan kontinuitas membran dan pembengkakan pada daerah membran dalam dan luar; (e) dan (f) sel yang diberi perlakuan dengan Laktoferrisin B pada konsentrasi $31\mu\text{M}$ selama 2 jam pada suhu 37°C ; tanda panah pada (e) menandakan *blister* pada membran luar

Sumber: Lopez-Exposito et al. (2008)



Gambar 4. Mikrograf TEM untuk *Staphylococcus carnosus* (a) dan (b) sel yang tidak diberi perlakuan; (c) dan (d) sel yang diberi perlakuan dengan α -S₂ kasein fragmen(183-207) pada konsentrasi 31 μ M selama 2 jam pada suhu 37°C; tanda panah pada (c) mengindikasikan *blister* pada membran luar; (e) dan (f) menunjukkan sel yang diberi perlakuan dengan Laktoferisin B pada konsentrasi 31 μ M selama 2 jam pada suhu 37°C

Sumber: Lopez-Exposito et al. (2008)

peptida mencegah pertukaran Zn (II) pada sisi aktif dengan Zn yang tidak terikat dalam lingkungan proteinase. Postulat tersebut sesuai dengan hambatan dari aktivitas proteinase oleh peptida dengan kelimpahan Zn (II) (Toh et al. 2011). Ikatan dengan ion divalensi seperti Zn (II) mungkin juga berfungsi untuk stabilisasi struktur peptida pada permukaan bakteri. Fungsi fosforilasi pada kappacin mungkin tidak hanya untuk konformasi tetapi juga memungkinkan ion divalensi melakukan ikatan silang dengan membran fosfolipida bakteri (Malkoski et al. 2001).

MODIFIKASI PEPTIDA ANTIMIKROBA

Pada mekanisme peptida antimikroba yang telah disebutkan sebelumnya diketahui bahwa beberapa peptida tersebut merupakan kationik kuat seperti caseicidin dan glikopeptida antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* maupun casocidin I yang merupakan peptida dengan kation tinggi diketahui dapat menghambat *E. coli* dan *Staphylococcus carnosus*. Peptida lain yang juga bermuatan positif adalah isracidin yang dapat menghambat *S. aureus* dan *L. monocytogenes* serta *C. albicans* (Norberg et al. 2011). Muatan positif tersebut yang memungkinkan peptida untuk berinteraksi dengan membran bakteri yang bermuatan negatif sehingga beberapa upaya dilakukan untuk meningkatkan kemampuan antimikroba melalui modifikasi terutama pada muatannya.

Walaupun demikian, tampaknya kondisi muatan residu menentukan aktivitasnya terhadap spesies atau strain tertentu. Sebagai contoh pada caseicin A (IKHQGLPQE) dan B (VLNENLLR) peptida derivat dari kasein yang aktif terhadap bakteri Gram negatif (*Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter mytjensii*, *Salmonella enteric* serovar typhimurium, *E. coli*,

Klebsiella pneumoniae dan *Pseudomonas fluorescens*) dan bakteri Gram positif *S. aureus*. Penggantian atau penghilangan residu kationik menyebabkan perubahan aktivitasnya. Sebagai contoh penggantian residu kationik caseicin menjadi alanin B1 (perubahan R8A), A1 (K2A), A2 (H3A), dan A3 (K2A-H3A) secara umum aktivitas antimikroba tidak berubah atau menurun. Walaupun demikian, penghilangan residu yang bermuatan positif pada caseicidin A1, A3 dan B2 justru meningkatkan sensitivitas *C. sakazakii* DPC6440. Sementara itu, penggantian residu leusin menjadi alanin pada B2 dan B4 menurunkan aktivitasnya terhadap strain *Cronobacter* dan beberapa kasus *S. typhimurium* tetapi meningkatkan aktivitasnya terhadap *C. sakazakii* DPC6440 dan sejumlah strain *S. aureus*. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa residu spesifik mempunyai arti yang penting dalam aktivitasnya terhadap strain bakteri tertentu (Norberg et al. 2011).

Modifikasi pada perlakuan juga dapat mempengaruhi aktivitasnya. Hasil fermentasi sodium kaseinate dengan *Lactobacillus acidophilus* tidak menunjukkan aktivitas antimikroba sebelum disaring melalui membran dengan ukuran pori 10 kDa. Dari hasil tersebut diketahui bahwa fraksinasi peptida berdasarkan ukuran dan muatan akan meningkatkan kemampuan antimikrobanya. Interaksi elektrostatik antara peptida yang bermuatan mempunyai pengaruh yang kurang baik terhadap kemampuannya. Fraksinasi dan purifikasi akan mengurangi interaksi antar peptida yang berbeda sehingga dapat memperbaiki aktivitas antimikrobanya (Hayes et al. 2006).

KEMUNGKINAN APLIKASI

Sehubungan dengan ketersediaan bahan baku, peptida antimikroba yang diperoleh dari susu

mempunyai kemungkinan yang besar untuk dikembangkan dalam skala komersial. Beberapa kendala teknis yang menjadi penghambat sebelumnya untuk produksi secara luas mulai teratasi dengan dikembangkannya beberapa teknik untuk meningkatkan produksi peptida dalam berat molekul tertentu. Nanofiltrasi dan ultrafiltrasi sekarang mulai digunakan dalam industri untuk menghasilkan *ingredient* yang mengandung peptida bioaktif spesifik berbahan dasar hidrolisat kasein atau *whey* (Sharma et al. 2011).

Beberapa peptida hasil hidrolisat kasein atau *whey* mempunyai aktivitas ganda, misalnya hidrolisat α S₂-kasein yaitu fragmen 203-208, PYVRYL, selain berfungsi sebagai antimikroba juga dapat berfungsi sebagai inhibitor *Angiotensin-converting enzyme* (ACE) sehingga dapat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan hipertensi dan antioksidan (Lopez-Exposito et al. 2007). Selain itu karena sifatnya yang tidak bereaksi dengan bahan makanan lain, peptida tersebut dapat diaplikasikan sebagai *ingredient* dalam berbagai makanan seperti minuman berbahan dasar susu atau buah dalam bentuk permen atau kapsul. Bahan dasar yang melimpah, kemudahan aplikasi baik dalam bidang medis maupun dalam makanan, cara konsumsi, multifungsi dan faktor keamanan dalam konsumsi membuat peptida dari kasein atau *whey* menjadi sangat potensial untuk dikembangkan lebih lanjut dalam skala yang lebih besar.

Penggunaan peptida antimikroba ke depan nampaknya menjadi semakin menarik perhatian. Preferensi konsumen yang mulai berubah yaitu menginginkan sedikit pemrosesan makanan dan mengandung sesedikit mungkin zat aditif kimia, pangan fungsional yang sehat, mengandung banyak nutrisi dan tidak menimbulkan alergi ikut mendukung kemungkinan penggunaan peptida. Peptida antimikroba menjadi menarik karena dapat digunakan sebagai pengawet yang *food grade* termasuk untuk produk-produk peternakan sekaligus dapat berfungsi sebagai pangan fungsional atau suplemen.

KESIMPULAN

Peptida antimikroba dapat dihasilkan dari pemecahan protein menjadi peptida melalui proses hidrolisis dengan enzim pencernaan maupun yang dihasilkan oleh mikroba. Kemampuan peptida antimikroba tersebut bervariasi tergantung pada panjang dan urutan asam amino di dalamnya yang akan mempengaruhi hidrofobisitas dan muatan sehingga mempengaruhi ikatan dan interaksinya dengan mikroba target. Peptida antimikroba mempunyai potensi karena aplikasinya yang mudah, tidak menimbulkan alergi dan resistensi mikroba karena mekanisme kerjanya yang

berbeda dengan antibiotika. Walaupun demikian upaya untuk produksi dalam skala besar melalui perbaikan metode maupun modifikasi masih harus dilakukan agar produk yang dihasilkan optimal dan harganya dapat terjangkau oleh masyarakat luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Atanasova J, Ivanova I. 2010. Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins. *Biotechnol Equip.* 24:1799-1803.
- Birkemo GA, O'Sullivan O, Ross RP, Hill C. 2009. Antimicrobial activity of two peptides caseicin 15 and 17, found naturally in bovine colostrums. *J Appl Microbiol.* 106:233-240.
- Bremel RD. 2013. Course note. University of Wisconsin [internet]. [cited 15 Mei 2013] Available from http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/milkcompsynth/milksynth_proteinbiochem.html
- Eber MR, Laxminarayan R, Perencevich EN, Malani A. 2010. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. *Arch Intern Med.* 170:347-353.
- Fjell C, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. 2012. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat Rev Drug Discov.* 11:37-51.
- Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C. 2006. casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl Environ Microbiol.* 72:2260-2264.
- Hayes M, Barrett E, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C. 2009. Evaluation of an antimicrobial ingredient prepared from a *Lactobacillus acidophilus* casein fermentate against *Enterobacter sakazakii*. *J Food Prot.* 72:340-346.
- Host A, Halken S. 2004. Hypoallergenic formulas-when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! *Allergy.* 59:45-52.
- Kent RM, Guinane CM, O'Connor PM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Ross RP. 2012. Production of the antimicrobial peptides Caseicin A and B by *Bacillus* isolates growing on sodium caseinate. *Lett Appl Microbiol.* 55:141-148.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J. 2007. Invasive methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* 298:1763-1771.
- Lahov E, Regelson W. 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol.* 34:131-145.
- López-Exposito I, Minervini F, Amigo L, Recio I. 2006. Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein. *J Food Prot.* 69:2992-2997.

- López-Expósito I, Amigo L, Recio I. 2008. Identification of the initial binding sites of α_{s2} -casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochim Biophys Acta*. 1778 Issue 10. p. 2444-2449.
- Malkoski M, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Talbo GH, Macris M, Cross KJ, Reynold EC. 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2309-2315
- McCann KB, Shiell BJ, Mikhalski WP, Lee A, Wan J, Roginski H, Coventry MJ. 2005. Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the fragmen (164-207) region of bovine α_{s2} -casein. *Int Dairy J*. 15:133-143.
- McCann KB, Shiell BJ, Michalski WP, Lee A, Wan J, Roginski H, Coventry MJ. 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *Int Dairy J*. 16:316-323.
- Muralidhara C, Haque E, Chand R. 2007. Antimicrobial peptides purified from bovine milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. *Milchwissenschaft*. 62:62-65.
- Norberg S, O'Connor PM, Stanton C, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2011. Altering the composition of caseicins A and B as a means of determining contribution of specific residues to antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol*. 77:2496-2501.
- Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, Fellenberg R. 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1426:439-448.
- Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta*. 1526:131-140.
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25:1605-1612.
- Recio I, Visser S. 1999. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine alpha(s2)-casein. *Biochim Biophys Acta*. 1428:314-326.
- Robitaille G, Lapointe C, Leclerc D, Britten M. 2012. Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *J Dairy Sci*. 95:1-8.
- Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. 2003. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*. 77:326-330.
- Sharma S, Singh R, Rana S. 2011. Bioactive peptides: A Review. *Int J Bioautomation*. 15:223-250.
- Szwajkowska M, Wolanciuk A, Barłowska J, Krol J, Zygmunt L. 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers immune system. *Anim Sci Pap Rep*. 29:269-280.
- Tidona F, Criscione A, Guastella AM, Zuccaro A, Bordonaro S, Marletta D. 2009. Bioactive peptides in dairy products. *Ital J Anim Sci*. 8:315-340.
- Toh ECY, Dashper SG, Huq NL, Attard TJ, O'Brien-Simpson NM, Chen Y, Cross KJ, Stanton D, Paolini RA, Reynold EC. 2011. *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinase inhibition by K-casein peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 55:1155-1161.
- Ulvatne H, Vorland LH. 2001. Bactericidal kinetics of 3 lactoferricins against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scand J Infect Dis*. 33:507-511.
- Umuhumuza LC, Wei-min N, Sun X. 2011. Effect of Bovine lactoferrin and casein peptide powder on microbial growth and glucose utilization by microorganisms in pork meat during storage at 4 C. *Pak J Nutr*. 10:208-213.
- Vincent JL, Rello J, Marshall J. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302:2323-2329.
- Vorland LH, Osbakk SA, Perstølen T, Ulvatne H, Rekdal O, Svendsen JS, Gutteberg TJ. 1999. Interference of the antimicrobial peptide lactoferricin B with the action of various antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis*. 31:173-177.
- Zacht H, Raida M, Adermann K, Magert H, Forssmann W. 1995. Casocidin-I: a casein- α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*. 372:185-188.