

PENGARUH EDTA TERHADAP AKTIVITAS LISOZIM SEBAGAI ANTIBAKTERI GRAM NEGATIF

EFFECT OF EDTA ON LISOZIM ACTIVITY AS A NEGATIVE GRAM ANTIBACTERIAL

*Desi Permata Sari dan Nuniek Herdyastuti**

*Departement of Chemistry, Faculty of Matematics and Natural Sciences
State University of Surabaya*

Jl. Ketintang Surabaya (60231), telp 031-8298761

*Corresponding author, email : nuniekherdyastuti@unesa.ac.id.

Abstrak. Aktivitas antibakteri lisozim terbatas terhadap bakteri strain Gram positif. Untuk meningkatkan pemanfaatan lisozim yang dapat bekerja pada bakteri Gram negatif, dapat dilakukan dengan penambahan EDTA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan larutan EDTA untuk mengubah aktivitas lisozim putih telur bebek menjadi antibakteri pada bakteri Gram negatif. Lisozim diperoleh dari ekstraksi menggunakan silika (SiO₂). Penentuan profil protein putih telur bebek yang dilakukan dengan SDS-PAGE menunjukkan adanya pita protein disekitar 10-16 kDa yang diduga terdapat lisozim. Penambahan larutan EDTA dengan konsentrasi 1 mg/mL menunjukkan adanya pengaruh terhadap aktivitas antibakteri ekstrak lisozim.

Kata Kunci : Aktivitas antibakteri, EDTA, Lisozim, Putih telur bebek.

Abstract. Lysozyme antibacterial activity is limited to Gram positive bacterial strains. To increase lysozyme utilization that can work on Gram negative bacteria, it can be done by adding EDTA. This study aims to determine the effect of the addition of EDTA solution to change the lysozyme activity of duck egg white to antibacterial in Gram negative bacteria. Lysozyme is obtained from extraction using silica (SiO₂). Determination of protein profiles of duck egg white carried out with SDS-PAGE showed the presence of protein bands around 10-16 kDa which were thought to be lysozyme. The addition of EDTA solution with a concentration of 1 mg / mL showed an effect on the antibacterial activity of lysozyme extract.

Keywords : Antibacterial activity, EDTA, Lysozyme Duck egg white.

PENDAHULUAN

Telur adalah salah satu sumber makanan yang banyak mengandung protein dan sangat umum bagi masyarakat. Pada putih telur bebek diketahui terdapat senyawa antibakteri yang disebut lisozim [1]. Lisozim adalah senyawa antibakteri yang dapat memutus ikatan glikosidik β-(1,4) antara asam N-asetilmuramat (NAM) dengan N-asetilglukosamin (NAG) dari lapisan peptidoglikan yang ada pada dinding sel bakteri [2]. Lisozim putih telur bebek memiliki aktivitas antibakteri lebih tinggi pada *Salmonella enteritidis* IFO3313 dibandingkan lisozim putih telur ayam [1]. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, lisozim putih telur bebek memiliki peluang besar untuk ditingkatkan penggunaannya menjadi skala industri.

Aktivitas antibakteri lisozim terbatas terhadap *strain* Gram positif [3];[4], ini disebabkan pada bakteri Gram positif

kandungan peptidoglikannya lebih banyak dibandingkan dengan bakteri Gram negatif [5]. Tebal peptidoglikan bakteri gram negatif hanya sebesar 2-7 nm dan memiliki membran luar dengan tebal 7-8 nm yang terdiri dari lipid, protein dan lipopolisakarida [6]. Bakteri yang memiliki sifat patogen merupakan bakteri Gram negatif seperti bakteri *Neisseria gonorrhoeae* merupakan penyebab penyakit gonorhea, *Escherichia coli* yang menyebabkan infeksi saluran pencernaan, dan *Salmonella typhosa* merupakan bakteri penyebab penyakit tifus. Meningkatkan pemanfaatan lisozim yang dapat bekerja pada bakteri Gram negatif, dapat menggunakan penambahan bahan *chelator*, seperti EDTA. EDTA merupakan agen pengkhelat yang mempunyai sifat antimikroba melalui kemampuannya membatasi

ketersediaan kation yang dapat mengganggu kestabilan membran sel bakteri dengan pembentukan kompleks kation divalen antara makromolekul membran seperti lipopolisakarida [7].

Berdasarkan pemaparan diatas, maka penelitian ini untuk menentukan aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek yang diberi perlakuan penambahan larutan EDTA pada bakteri Gram negatif. Dengan perbedaan konsentrasi larutan EDTA yang digunakan adalah 0,5; 1 dan 1,5 mg/mL. Aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek dapat diketahui dengan menggunakan bakteri penguji (*Escherichia coli*) yang nantinya akan diuji dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 445 nm.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, vortex, rak tabung reaksi, bluetip, kuvet, inkubator (memmert), pH meter, magnetic stirrer, refrigerator, laminar air flow UL-US (Thermo Fisher Scientific), digital vortex mixer, seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE (Bio Red), mikropipet, autoclave, sentrifuge (eppendorf 5810R), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1800), peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium [8].

Bahan

Bahan yang digunakan adalah telur bebek dari pedagang telur di Pasar Wonokusumo Surabaya, asam asetat 1 N, NaCl 0,05 M, silica (SiO₂), aquademin (Brataco), EDTA, Buffer fosfat (Na₂HPO₄) 0,1 M, 0,066 M Buffer fosfat (pH 6,24), Nutrient Broth (Oxoid), agar, kultur bakteri (*Escherichia coli*).

Prosedur Penelitian

a. Tahap Ekstraksi Lisozim Putih Telur Bebek

Putih telur bebek (20 mL) ditambahkan asam asetat 1 N sampai pH 4, ditambahkan 60 mL NaCl 0,05 M dan distirer selama 15 menit. Ditambahkan 0,851 gr silica (SiO₂) dan distirer selama 10 menit. Lalu ditambahkan 20 mL Buffer fosfat 0,1 M dan distirer selama 5 menit. Dibiarkan semalam pada suhu 4°C, setelah itu distirer selama 5 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 4°C

selama 20 menit, kemudian diambil supernatannya untuk dianalisis.

b. Tahap Penentuan Profil Protein dari Putih Telur Bebek

Untuk profil protein dari putih telur bebek ditentukan dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

c. Perubahan Kemampuan Lisozim Putih Telur Bebek dengan Penambahan Larutan EDTA

Larutan lisozim putih telur bebek (5 mL) ditambahkan 5 mL larutan EDTA dengan perbedaan konsentrasi (0,5; 1 dan 1,5 mg/mL) sambil dikocok dan dianalisis.

d. Tahap Penentuan Aktivitas Antibakteri Lisozim Putih Telur Bebek

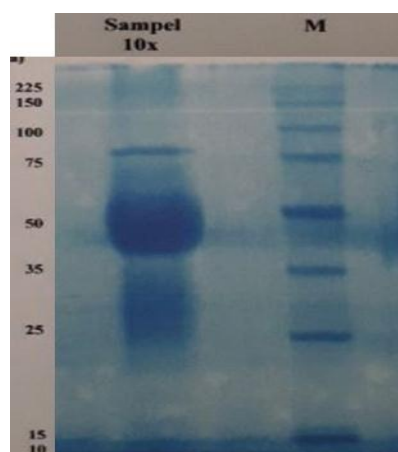
Mencampurkan suspensi bakteri ke dalam 0,066 M Buffer fosfat (pH 6,24). Diambil 2,98 mL dan ditambahkan 20 µL sampel ekstrak kasar lisozim. Dicampur hingga merata dan diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 445 nm. Diamati perubahannya setiap 30 detik selama 120 detik. Dengan penurunan absorbansi pada panjang gelombang 445 nm dari 0,001/min dicatat sebagai 1 unit aktivitas enzim, dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas lisozim (U/mL)} = \frac{\Delta A_{445/\text{min}}}{0,001/\text{min} \times 0,02 \text{ mL}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Penentuan Profil Protein Putih Telur Bebek

Profil protein dari putih telur bebek, dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE. Elektroforegram hasil analisis dengan SDS-PAGE, dapat dilihat seperti pada Gambar 1



Gambar 1. Elektroforegram Hasil SDS-PAGE

Penentuan profil protein putih telur bebek yang dilakukan dengan SDS-PAGE menunjukkan adanya pita protein disekitar 10-16 kDa yang diduga terdapat lisozim (Gambar 1). Putih telur bebek diketahui mengandung senyawa antibakteri yang disebut lisozim [1]. Berat molekul senyawa lisozim yang bersumber dari susu kerbau sebesar 16 kDa [11], lisozim putih telur ayam memiliki berat molekul sebesar 14,4 kDa [12] dan berat molekul lisozim putih telur bebek berkisar sebesar 14,0 kDa [9]. Hasil dari penelitian ini dapat diduga, bahwa putih telur bebek yang telah melalui proses ekstraksi mengandung lisozim yang memiliki berat molekul berkisar 10-16 kDa.

b. Penentuan Aktivitas Antibakteri Lisozim Putih Telur Bebek dengan Proses Penambahan Larutan EDTA

Hasil analisis aktivitas antibakteri lisozim dengan perlakuan penambahan larutan EDTA terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat disajikan dalam Tabel 1

Tabel 1. Aktivitas Antibakteri Lisozim dengan Penambahan Larutan EDTA Terhadap Bakteri *Escherichia coli*

EDTA (mg/mL)	Aktivitas Antibakteri Lisozim (U/mL)
Kontrol	83
0,5	467
1	800
1,5	375

Tabel 1 menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek yang telah diujikan pada bakteri *Escherichia coli* mengalami peningkatan dengan adanya perlakuan penambahan larutan EDTA jika dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, diketahui bahwa lisozim putih telur bebek dengan perlakuan penambahan larutan EDTA 0,5 mg/mL memiliki aktivitas antibakteri sebesar 467 U/mL. Aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek tertinggi diperoleh dari perlakuan penambahan larutan EDTA 1 mg/mL, yaitu sebesar 800 U/mL. EDTA mengikat kation divalen (Mg^{2+} atau Ca^{2+}) yang menghubungkan molekul-molekul lipopolisakarida, sehingga bagian lipopolisakarida akan berubah struktur menjadi supramolekuler yang tidak teratur. Fosfolipid akan mengisi kekosongan dan memungkinkan molekul lisozim untuk berdifusi masuk kedalam dinding sel bakteri Gram negatif dan memutus ikatan glikosidik β -1,4 antara N-asetilglukosamin (NAG) dan asam N-asetilmuramat (NAM) yang terdapat pada peptidoglikan. Pengaruh penambahan beberapa jenis bahan *chelator* dan salah satu *chelator* yang ditambahkan adalah EDTA membuktikan bahwa dengan menambahkan larutan EDTA ke dalam lisozim dapat melisis bakteri Gram negatif yang diujikan pada empat strain *E. coli* O157: H7, namun dalam penelitiannya tidak diketahui konsentrasi optimal dari larutan EDTA yang ditambahkan kedalam lisozim untuk menghasilkan aktivitas antibakteri lisozim yang tertinggi [10].

Aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek dengan perlakuan penambahan larutan EDTA 1,5 mg/mL mengalami penurunan yaitu sebesar 375 U/mL. Penurunan aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek terhadap bakteri *Escherichia coli*, diduga karena dengan penambahan larutan EDTA dengan konsentrasi yang terlalu tinggi dapat mengubah konformasi senyawa dari lisozim. EDTA merupakan salah satu jenis inhibitor reversibel non-kompetitif yang dapat berikatan pada sisi lain enzim. Dengan berubahnya konformasi senyawa

dari lisozim dapat menurunkan pelepasan lisozim, sehingga akan menurunkan tingkat kontak antara lisozim dengan dinding sel bakteri. Sehingga aktivitas antibakteri lisozim putih telur bebek terhadap Bakteri *E. coli* menurun.

SIMPULAN

Larutan EDTA 1 mg/mL mampu mengubah aktivitas antibakteri ekstrak lisozim terhadap bakteri Gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Naknukool, S., Hayakawa, S., Uno, T., Ogawa, M. 2006. *Antimicrobial activity of duck egg lysozyme againsts Salmonella enteritidis*. Department of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, IUFOST DOI: 10.1051/IUFOST:20060308.
- [2]. Radziejewska, C., G. Lesnirowski, and J. Kijowski, 2003. *Antibacterial Activity of Lysozyme Modified by The Membrane Technique*. *Electronic Journal of Polish agricultural Universities*. J. Food sci. and Tech. 6 (2).
- [3]. Lesnierowski, G., J. Kijowski, and J. Stangierski. 2003. *DCS, SDS-PAGE and Spectrophotometry for Charactization of Modified Lysozyme*. *Electronic Journal of Polish Agric. Universities*. J. Food Sci. and Tech. 6.(1).
- [4]. Susanto, E. 2013. *Peningkatan Spektrum Antibakteri Lisozim putih Telur dengan Modifikasi Thermal*. J. Ternak Fakultas Peternakan UNISLA Vol.4 No.2 : 3-10.
- [5]. Sumarsih, Sri. 2003. *Diktat Kuliah Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Ilmu Tanah. Fakultas Pertanian. UPN-Veteran. Yogyakarta. Han.
- [6]. Herdyastuti, Nuniek. 2009. *Kitinase dan Mikroorganisme Kitinolitik*, *Jurnal Chem.*, Vol. 9, No. 1.
- [7]. Vaara, M. 1992. *Agents that increase the permeability of the outer membrane*. *Microbiol. Rev.* 56: 395-411.
- [8]. Ding, Zhaoyang, Sipeng Li dan Xuejun Cao. 2014. *Separation Of Lysozyme From Salted Duck Egg White By Affinity Precipitation Using Ph-Responsive Polymer With An L-Thyroxin Ligand*. *Separation and Purification Technology* 138 153–160.
- [9]. Herdyastuti, Nuniek, Tri Joko Raharjo, Mudasir dan Sabirin Matsjeh. 2009. *Kitin Dari Limbah Cangkang Udang Sebagai Media Untuk Bakteri Kitinolitik Yang Diisolasi Dari Lumpur Sawah*. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, Vol. 16, No. 2.
- [10]. Boland J.S., Davidson P.M., Weiss, J. 2003. *Enhanced inhibition of Escherichia coli O 157:H7 by lysozyme and chelators*. *J. Food Prot.* 66, 1783-1789.
- [11]. Priyadarshini S & Kansal V.K. 2002. *Purification, Characterization, Antibacterial Activity And N-Terminal Sequencing Of Buffalo Milk Lysozyme*. *Journal of Dairy Research* 69 419–431.
- [12]. Cegielska, R. R., Lesnierowski, G., Kijowski, J. 2008. *Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations—A review*. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58 (1), 5–10.