

ARTIKEL  
PENELITIAN DOSEN MUDA



**OPTIMASI PEMISAHAN DAN UJI AKTIVITAS PROTEIN  
ANTIBAKTERI DARI CAIRAN SELOM CACING TANAH  
*Perionyx excavatus.***

Oleh :

**Yumaihana, M.Si**

Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan  
UNIVERSITAS ANDALAS

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian Nomor : 001/SP2H/PP/DP2M/III/2007, tanggal 29 Maret 2007

# Optimasi Pemisahan dan Uji Aktivitas Protein Antibakteri dari Cairan Selom Cacing Tanah *Perionyx excavatus*.

Yumaihana MSi\*

\*Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak, Faterna UNAND

## Abstrak

Cairan selom adalah cairan yang terdapat dalam cacing tanah dan berperan penting untuk sistem kekebalannya. Banyak protein-protein pendegradasi dinding sel yang terkandung di cairan selom, membuat cacing memiliki aktivitas antibakteri dan sejumlah fungsi fisiologi lain. Penelitian pendahuluan telah mengidentifikasi bahwa cacing *P. excavatus* galur lokal memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus megaterium*. Molekul antibakteri ini sangat tidak stabil dan mudah sekali terdegradasi. Beberapa usaha telah dilakukan untuk melihat daya tahan aktivitas antibakteri ini pada tiga variasi suhu, yaitu 26, 4 dan  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cairan selom segar yang disimpan selama 3 bulan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ , dan cairan selom dalam gliserol 1,5% yang disimpan selama 13 hari pada  $4^{\circ}\text{C}$  masih menunjukkan aktivitas antibakteri. Pemisahan protein – protein dalam cairan selom dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi penukar anion (DEAE-sefarosa). Fraksi yang diperoleh diuji aktivitas anti-*B. megaterium* secara kualitatif dan ternyata hanya fraksi pada puncak kedua yang aktif sebagai anti bakteri.

Kata Kunci : Cairan selom, *P. Excavatus*, DEAE

## Pendahuluan

*Perionyx excavatus* tergolong cacing tanah yang tidak patogen dan mudah didapatkan disampah-sampah. Jenis cacing ini sangat mirip dengan *E. fetida* namun warnanya lebih gelap dan gerakannya lebih cepat. *P. excavatus* disebut juga india blue, bark worms, spiketails dan mudah dibedakan dari *E. fetida*. *P. excavatus* mempunyai kilau biru yang bisa berkurang atau bertambah

sesuai jenis makanannya. Cacing ini jauh lebih lincah dari *E. fetida*.

Hewan yang mempunyai rongga tubuh bagian dalam disebut *coelomates* (selomat) dan rongganya disebut *coelom* (selom ). Cairan yang terdapat di dalam selom disebut cairan selom, berfungsi untuk membantu respirasi dan sirkulasi penyebaran nutrisi, dan ekskresi cairan buangan. Cairan selom terdapat dalam sejumlah sistem organ pada hewan tingkat tinggi termasuk manusia. Cairan

selom juga bisa menjadi tempat menyimpan telur dan sperma seperti pada ikan, memfasilitasi pertumbuhan gamet dalam tubuh hewan. Cairan ini melindungi organ dalam dan juga sebagai hidrostatis kerangka. Tetapi komposisi protein dalam cairan selom masih sangat sedikit dipelajari. Bila cacing ditusuk maka ia akan kehilangan kemampuan untuk bergerak dengan baik, karena fungsi otot tubuh tergantung pada volume cairan dalam selom. Tetapi cacing juga mempunyai kemampuan istimewa untuk meregenerasi bagian tubuh yang hilang.

Penelitian awal yang telah dilakukan menunjukkan bahwa cacing tanah mengeluarkan cairan kuning terang disertai juga lipoprotein berwarna kuning dan kental. Setiap gram cacing dapat menghasilkan  $\pm 40,73 \mu\text{L}$ . Variasi isolasi cairan selom dilakukan pada beberapa kondisi cacing (variable), yang membawa efek terhadap kemampuan imun tubuh dalam membunuh bakteri. Lebih jauh cacing *P. Excavatus* dapat menghasilkan keturunan yang tidak memiliki protein anti bakteri tertentu, tetapi masih memiliki molekul antibakteri lain yang sangat kompleks.

## **Materi dan Metoda**

Uji aktivitas protein anti-Bacillus Megaterium dilakukan dengan cara kualitatif (zona bening) dan kuantitatif (spektroskopi,  $\text{OD}_{600}$ ). Beberapa variasi dilakukan untuk menguji daya tahan aktivitas protein antibakteri. Pemisahan protein aktif antibakteri dengan yang tidak, dilakukan secara Kromatografi penukar anion dengan kolom HiPrep 16/10 DEAE dari Pharmacia. Buffer adalah Tris-Cl 25 mM, pH 8. Elusi menggunakan buffer NaCl 1M dalam Tris, dengan gradien bertingkat : 5 menit 0-5%, 0 menit 5-9%, 15 menit 15-20%, 0 menit 25-50%, 15 menit 50-70%, 0 menit 70-80% dan 15 menit 80-100% NaCl.

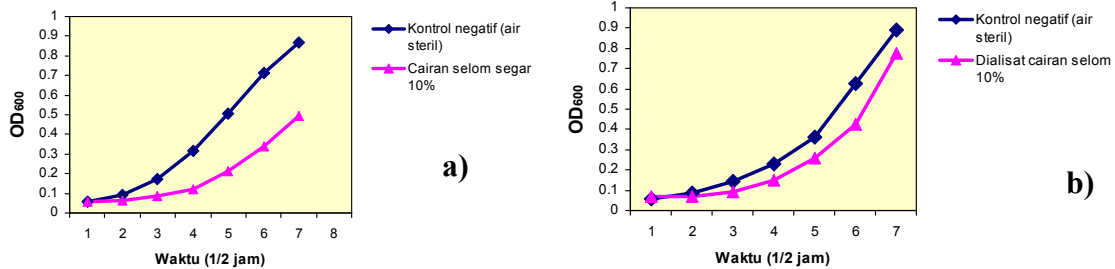
## **Hasil dan Pembahasan**

### **Aktivitas Cairan Selom**

Cairan selom yang diisolasi dari cacing segar memiliki aktivitas antibakteri yang cukup bagus. Pertumbuhan *B. megaterium* dihambat 39,43% setelah inkubasi pada suhu kamar (Gambar 1.a). Uji pendahuluan menunjukkan adanya molekul dalam cairan selom yang muncul sebagai puncak tajam diawal elusi pada

kromatografi penukar anion (Gambar tidak ditampilkan). Molekul bukan protein yang memiliki aktivitas antibakteri ini dikhawatirkan akan mengganggu dalam proses pemurnian. Dialisis ekstrak kasar dilakukan 16–18 jam terhadap aquabides, untuk

menghilangkan pengaruh ini. Aktivitas antibakteri diuji secara kuantitatif (Gambar I.b).



**Gambar 1 Kurva pertumbuhan *B. megaterium*** (a) Cairan selom 10% memperlambat pertumbuhan bakteri 39,43% dari kontrol. (b) Dialisat cairan selom 10% memperlambat pertumbuhan bakteri 37,2% dari kontrol.

Perlakuan dialisis akan menghilangkan kontaminan dan sisa metabolit yang mungkin ada, tetapi cara ini juga menurunkan aktivitas antibakteri cairan selom 2,23% dibanding dengan ekstrak kasar yaitu menjadi 37,2%. Hal ini disebabkan oleh keluarnya sebagian protein aktif lain yang antibakteri dan protein berukuran kecil melalui pori filter dialisis ke medium sehingga jumlah protein yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri jadi berkurang.

Cara lain dilakukan untuk menghilangkan kontaminan adalah

dengan ultrafiltrasi. Kedua variasi ini menghasilkan tampilan kromatogram yang sama pada saat pemurnian, tetapi kelemahan ultrafiltrasi adalah banyaknya sampel yang menempel pada membran filter.

### Optimasi penyimpanan cairan selom

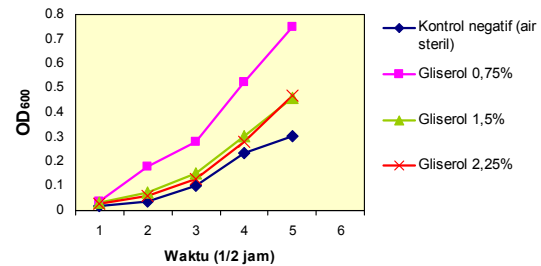
#### \* Penyimpanan pada suhu kamar

Cairan selom sangat tidak stabil dan mudah terdegradasi bila disimpan pada suhu kamar (26°C), dan suhu 37°C. Sedangkan cairan selom yang disimpan pada suhu 4 dan –20°C masih memiliki

aktivitas antibakteri meskipun nilainya lebih kecil dibandingkan dengan cairan selom segar (Sujatioadi, 2004). Hilangnya aktivitas antibakteri cairan selom dimungkinkan karena adanya protease yang terdapat pada cairan ini. Pada suhu ruang dan suhu 37°C protease dapat bekerja secara optimum sehingga dapat menghancurkan protein-protein yang memiliki aktivitas antibakteri yang terdapat pada cairan selom, sedangkan pada suhu 4 dan -20°C kerja protease mengalami penurunan.

Cairan selom yang disimpan disuhu kamar (26°C) tanpa menggunakan agen apa-apa, akan kehilangan aktivitas antibakterinya dalam 4 jam. Untuk mempertahankan kerja protein yang aktif terhadap bakteri, telah digunakan gliserol. Uji aktivitas satu hari penyimpanan pada suhu 26°C menunjukkan hasil yang negatif terhadap *B. megaterium*. Semua pertumbuhan *B. megaterium* dikultur yang menggunakan selom 10% berada di atas pertumbuhan kontrol. Pemakaian gliserol 0,75%, 1,5%, dan 2,25% tidak dapat mempertahankan kerja protein antibakteri ini. Penyimpanan 1, 2, dan 3 hari pada suhu kamar tetap membuat protein terdegradasi dan kehilangan

aktivitas antibakterinya. Tapi dari percobaan ini dapat diambil kesimpulan bahwa penggunaan gliserol 1,5% menunjukkan performa yang lebih bagus dibanding yang lain (Gambar 2).



**Gambar 2. Kurva pertumbuhan *B. Megaterium* di suhu kamar. Media pertumbuhan mengandung cairan selom dalam berbagai konsentrasi gliserol.**

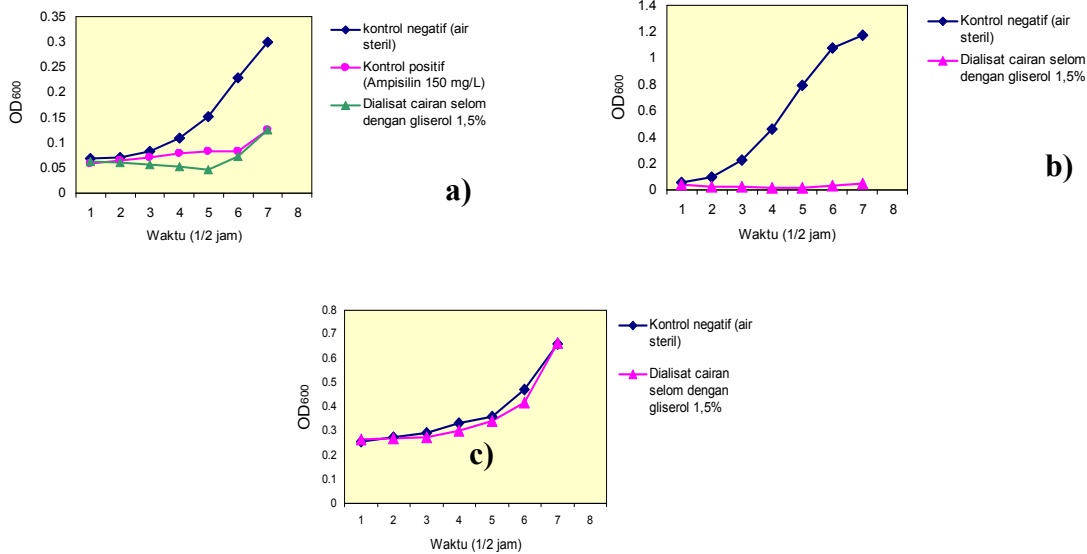
Kemampuan aktivitas antibakteri dari cairan selom yang ditambahkan gliserol 1,5% hampir sama dengan gliserol 2,25 %, tetapi penggunaan gliserol 2,25% menyebabkan terjadinya pengendapan protein 1 jam berikutnya. Dengan alasan tersebut, maka untuk pengujian terhadap sampel lain digunakan gliserol 1,5%.

### Penyimpanan disuhu 4°C

Penyimpanan cairan selom pada 4°C menunjukkan aktivitas yang cukup baik untuk masa penyimpanan yang tidak lama (1 hari). Penambahan gliserol 1,5% memberikan pengaruh terhadap aktivitas

antibakteri cairan selom yang disimpan pada suhu ini. Cairan selom menunjukkan aktivitas antibakteri dihari ke-3 dan 13 penyimpanan, terbukti dengan kurva tumbuh bakteri dalam kultur mengandung cairan selom berada di bawah pertumbuhan kontrol negatif.

Tetapi hari ke-25 aktivitas antibakteri sudah hampir hilang, pertumbuhan bakteri dalam kultur yang mengandung cairan selom 1,5% hampir sama dengan pertumbuhan bakteri kontrol (Gambar 3).



**Gambar 3. Kurva pertumbuhan *B. megaterium* di suhu 4°C dalam media yang mengandung cairan selom dalam gliserol 10%. (a) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari ke-3 penyimpanan. (b) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari ke-13 penyimpanan. (c) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari ke-25 penyimpanan.**

Pengaruh penggunaan gliserol 1,5% bisa memperlama waktu penyimpanan cairan selom, karena gliserol dapat meningkatkan stabilitas struktur protein asli sehingga melindungi aktivitas antibakteri. Gliserol mencegah protein terhadap inaktivasi termal dan agregasi, tergantung dari konsentrasi yang

digunakan. Pengaruh osmofobik gliserol, meningkatkan energi bebas dari kompleks yang diaktifkan dan menggeser kesetimbangan diantara bentuk protein asli dan kompleks asli yang diaktifkan.

Beberapa tahun terakhir orang telah mengenal gliserol sebagai salah satu

senyawa penstabil protein. Diawal penelitian, sebagian ahli berpendapat bahwa mekanisme gliserol mempertahankan stabilitas protein dimulai dari sifat molekul gliserol yang bisa membentuk semacam kantung disekitar protein. Tetapi studi lebih lanjut tentang gliserol menunjukkan bahwa substansi ini tidak terikat dengan cara biasa ke protein, tetapi kehadirannya dapat merubah tekanan permukaan air disekitar protein. Dengan cara yang sangat istimewa, gliserol dapat mengosongkan air dilapisan permukaan protein. Ini berarti protein mengalami hidrasi disekitar permukaannya. Proses ini meningkatkan energi bebas dan selanjutnya melindungi protein terhadap denaturasi. Studi terakhir menemukan bahwa gliserol mempengaruhi induksi-tekanan unfolding. Pergeseran keseimbangan bertambah kearah kiri dari persamaan reaksi kesetimbangan :



Pergeseran secara teoritis dari tekanan pembukaan lipatan dihitung dari batas peningkatan energi bebas oleh perubahan gliserol yang lebih rendah dari yang tidak memakai penstabil protein. Ini mengindikasikan bahwa

perubahan energi bebas yang disebabkan oleh hidrasi istimewa dari protein bukanlah faktor unik yang terlibat dalam stabilitas protein. Kontraksi antar permukaan pelarut-protein disebabkan oleh meningkatnya potensial kimia, disertai oleh peluncuran air dari dalam protein sebagai akibat dari naiknya nilai densiti inti. Aditif bisa menurunkan volume bagian dalam protein. Reduksi volume diduga bisa menghasilkan tekanan osmisis. Kuatnya osmosis tergantung pada ukuran molekul dan konsentrasi osmolit. Hubungan energi bebas dengan perubahan volum dapat dijelaskan sebagai :

$$\Delta G = 0,234 \times \Delta V \times P_{1/2}$$

Dimana  $\Delta G = \text{kal. mol}^{-1}$ ,  $\Delta V = \text{mL. mol}^{-1}$ , dan  $P_{1/2} = \text{MPa}$ .

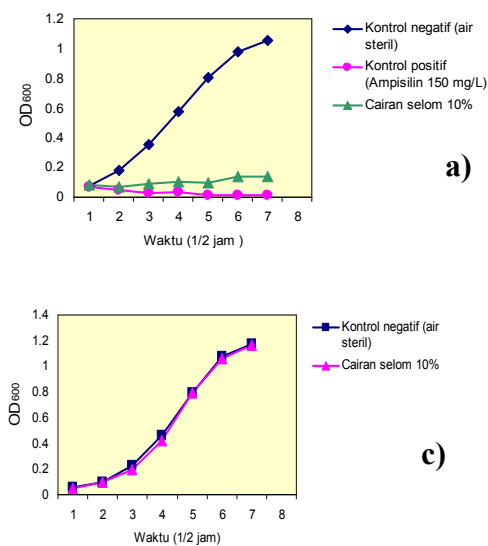
Kecepatan induksi-tekanan unfolding lebih lambat dengan adanya gliserol dibanding kecepatan pelipatan ulang yaitu menjadi 1,5x lebih lama dari refolding, walaupun kecepatan keduanya sama-sama lebih lambat dibanding jika tidak memakai penstabil protein. Ini artinya gliserol meningkatkan stabilitas struktur keseluruhan protein.

### **Penyimpanan cairan selom di $-20^{\circ}\text{C}$**

Penyimpanan cairan selom pada suhu –

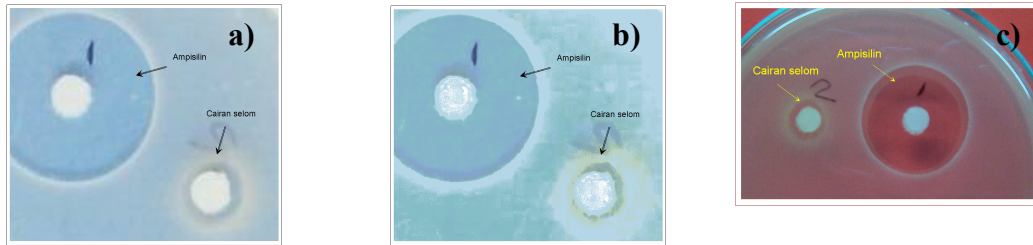
20°C bisa mempertahankan aktivitas protein antibakteri sampai lebih dari tiga bulan (107 hari). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan secara bertahap (Gambar 4. dan Gambar.5). Pada satu hari penyimpanan, cairan selom memperlihatkan aktivitas inhibisi terhadap bakteri sebanyak 98%, dan setelah disimpan 69 hari, aktivitas enzim masih bagus yaitu bisa menghambat pertumbuhan *B. megaterium* sebanyak 72,3%. Walaupun terjadi penurunan aktivitas antibakteri, tetapi uji kualitatif protein masih menunjukkan daerah bening disekitar kertas cakram pada hari ke 87 dan 107 masa penyimpanan. Lebar daerah bening semakin berkurang dengan semakin lamanya penyimpanan. Penurunan kekuatan aktivitas

antibakteri ini disebabkan oleh berkurangnya kadar protein akibat degradasi. Pengukuran kadar protein cairan selom yang sama setelah berselang 35 hari membuktikan turunnya kadar protein dalam cairan selom dari 22,475 mg/mL menjadi 15,624 mg/mL. Hari ke 138 penyimpanan cairan selom disuhu -20°C protein sudah tidak memiliki aktivitas antibakteri lagi, dimana pertumbuhan bakteri dikultur yang mengandung cairan selom sama dengan laju pertumbuhan bakteri kontrol negatif. Penurunan aktivitas antibakteri ini disebabkan oleh kerja enzim protease yang terdapat di dalam cairan selom yang tetap bekerja dalam suhu rendah tetapi dengan kecepatan yang rendah juga.



**Gambar 4 Kurva pertumbuhan *B. megaterium* pada suhu -20°C. (a) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari pertama penyimpanan. (b) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari ke-69 penyimpanan. (c) Aktivitas antibakteri cairan selom setelah hari ke-138 penyimpanan.**

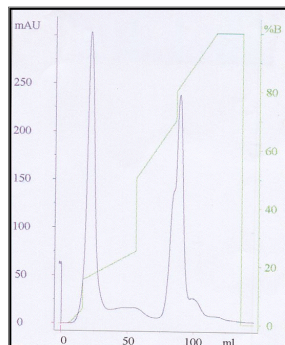




**Gambar 5 Zona inhibisi cairan selom.** (a) Setelah penyimpanan selama 87 hari pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . (b) Setelah penyimpanan selama 107 hari pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Pemisahan protein dengan kolom DEAE-sefarosa

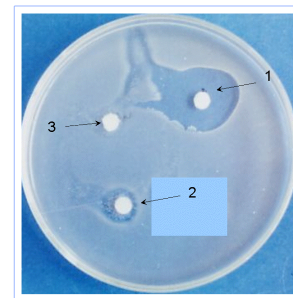
Cairan selom yang memiliki aktivitas antibakteri disaring dengan filter berukuran  $0,45\ \mu\text{m}$  dan dimurnikan dengan kolom DEAE-agarosa. Gradien elusi oleh bufer garam NaCl diatur sedemikian rupa sehingga dihasilkan dua puncak terpisah yang cukup tajam (Gambar.6).



**Gambar 6 Pemurnian cairan selom dengan kolom DEAE-sefarosa.**

Fraksi ditampung secara selektif dan pengujian kualitatif membuktikan bahwa puncak pertama memiliki aktivitas

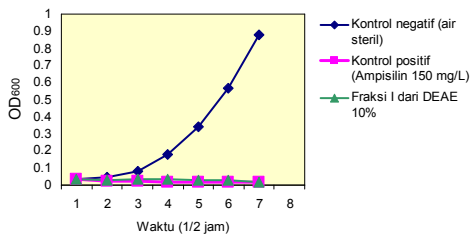
antibakteri sementara puncak kedua tidak memiliki aktivitas (Gambar 7).



**Gambar 7. Zona inhibisi dari fraksi-fraksi kolom DEAE-sefarosa.** 1.  $20\ \mu\text{l}$  ampicilin  $150\ \mu\text{g}/\text{mL}$ . 2.  $20\ \mu\text{l}$  fraksi puncak I. 3.  $20\ \mu\text{l}$  fraksi puncak II.

Hasil uji antibakteri cairan selom fraksi puncak I menunjukkan peningkatan inhibisi pertumbuhan *B. megaterium* (Gambar 8). Pada satu jam pertama pertumbuhan bakteri dihambat 88,6% dan pada dua jam berikutnya terjadi penurunan pertumbuhan bakteri mendekati nol (inhibisi 100%). Uji kualitatif menunjukkan daerah bening yang cukup tajam pada daerah sekitar kertas cakram yang membuktikan

aktivitas cairan selom dari tingkat pemurnian dengan DEAE cukup bagus.



**Gambar 8 Kurva pertumbuhan *Bacillus megaterium***

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri Cairan Selom cacing *P.excavatus* dapat bertahan lama (3 bulan) bila disimpan disuhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan 13 hari di suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan penambahan gliserol 10%.

Kromatografi penukar anion (DEAE-sefarosa) dapat memisahkan molekul anti bakteri dengan molekul yang bukan antibakteri. Pemisahan ini merupakan awal dari tahap pemurnian protein antibakteri selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

Baier, K.S., and McClements, D.J., (2005), Influence of cosolvent systems on the gelation mechanism of globular protein : thermodynamic, kinetic, and structural aspects of globular protein gelation, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **4**, 43-53.

Blakemore, R., (2001), Tasmanian earthworm grows second head, *Invertebrata*, **20**.

Cassell, G.H., and Mekalanos, (2001), Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance., *JAMA*, **285**, 601-605.

Chauduri, P.S., and Bhattacharjee, G., (2002), Capacity of various experimental diets to support biomass and reproduction of *Perionyx excavatus*, *Bioresource technology*, **82(2)**, 147-150.

Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, G.Y., Kim, S.C., (1998), Lumbricin I, a novel prolin-rich antimicrobial peptide from the earthworm : purification, cDNA cloning and molecular characterization, *BBA*, **1408**, 67-76.

Cooper, E.L., and Roch, P., (2003), Earthworm immunity : a model of immune competence, *Pedobiologia*, **47**.

Cooper, E.L., Kauschke, E., and Cossarizza, A., (2002), Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff, *Bioassays*, **24(4)**, 319-333.

Dhainaut, A., Scaps, P., (2001), Immune defense and biological responses induced by toxics in annelida, *Can. J. Zoo./Ref. Can. Zoo.*, **79(2)**, 233-253.

Edwar, C.A., Dominguez, J., Neunauser, E.F., (1998), Growth and reproduction of *Peronyx excavatus* (Perr.) (Megascolecidae) as factor in organic waste management, *Biol Fertil Soil*, **27**, 155-161.

Engelmann, P., Kiss, J., Csongei, V., Cooper, E.L., Nemeth, P., (2004), Earthworm leukocytes kill HeLa, Hep-2, PC-12 and PA317 cells in vitro, *J. Biochem. Biophys. Methodes*, **61**, 215-227.

Engelmann, P., Molnar, L., Palinkas, L., Cooper, E.L., (2004), Earthworm leukocytes populations specifically harbor lysosomal

enzyme that may respond to bacterial challenge, *Cell tissue res*, **316**, 391-401.

Eue, I., Kauschke, E., Mohrig, W., and Cooper, E.L., (1998), Isolation and characterization of earthworm hemolysins and agglutinins, *Developmental and comparative immunology*, **22 (1)**, 13-25.

Field, E.G., Kurtz, J., Cooper, E.L., and Michiels, N.K., (2004), Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworm, *J. invertebrate pathology*, **86**, 45-49.

Goven, A.J., Chen, S.C., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., (1994), Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes : enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics, *Environmental toxicology and chemistry*, **13(4)**.

Hallatt, L., Viljoen, S.A., and Reinecke, A.J., (1992), Moisture requirements in the life cycle of *Perionyx excavatus (Oligochaeta)*, *Soil Biology and Biochem.*, **24(12)**, 1333-1340.

Hanusova, R., Tuckova, L., Halada, P., Bezouska, K., (1999), Peptide fragments induce a more rapid immune response than intact protein in earthworms, *Developmental and comparative immunology*, **23**, 113-121.

Heitz, F., Mau, N.V., (2002), Protein structural changes induced by their uptake at interfaces, *BBA*, **1597**, 1-11.

Lange, S., Kauschke, E., Mohrig, W., and Cooper, E.L., (1999), Biochemical characteristics of Eiseniapore, a pore-forming protein in the coelomic fluids of earthworms, *J. Biochem*, **262**, 547-556.

Lassalle, F., Lassegues, M., and Roch, P., (1988), Protein analysis of earthworm coelomic fluid-IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (Annelidae), *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B(1)**, 187-192.

Liu, Y.Q., Sun, Z.J., Wang, C., Li, S.J., and Liu, Y.Z., (2004), Purification of novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida*, *BBA sinica*, **36(4)**, 297-302.

**Kesimpulan**

**Terimakasih**

**Daftar Pustaka**