

RINGKASAN LAPORAN
PENELITIAN DOSEN MUDA



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

Oleh :
Yumaihana MSi

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

Pendahuluan

Sistem kekebalan tubuh makhluk hidup telah dipelajari dari berbagai sudut pandang. Analisis sistem pertahanan invertebrata seperti cacing tanah, adalah bagian penting dari penelitian sistem ini. Sistem kekebalan tubuh invertebrata dibawa dari lahir, alami dan non-spesifik. Sistem ini berbeda dengan sistem kekebalan vertebrata dimana bisa dikategorikan memiliki sifat adaptif, induksi, dan spesifik. Selama proses evolusi, cacing telah mengembangkan strategi daya tahan tubuhnya terhadap lingkungan yang banyak mengandung mikroorganisme patogen. Sekalipun mereka kekurangan antibodi, tetapi sistem tubuhnya memiliki sejumlah leukosit, enzim pensintesis dan mensekresikan bermacam-macam molekul immunoprotektif yang membuatnya bisa bertahan terhadap serangan organisme dan material asing.

Cacing tanah *L. rubellus* dan *Ph. Aspergillum* telah banyak dibudi-dayakan di Indonesia, berbeda dengan *Eisenia fetida* dan *Perionyx excavatus* yang belum begitu dikenal. Cacing tanah diketahui rendah lemak, hanya 3 hingga 10 persen dari bobot keringnya. Seperti cacing lain, *Perionyx excavatus* **memiliki sifat antibakteri terhadap beberapa mikroorganisme yang diuji**. *P. excavatus* varietas lokal diprediksi memiliki sifat istimewa karena hidup di lingkungan yang jauh berbeda dari cacing – cacing yang telah banyak diteliti. Komposisi tanah, iklim dan kebiasaan manusianya yang unik jelas mempengaruhi organisme lain sebagai bagian dari rantai kehidupan. Penelitian awal menunjukkan bahwa makanan dan lingkungan tumbuh cacing tanah mempengaruhi aktivitas kandungan protein anti bakteri dalam cairan selomnya. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap daya tahan aktivitas antibakteri cairan selom pada berbagai suhu dan usaha pemisahan protein yang berperan dalam aktivitas ini sebagai tahap awal pemurnian protein.

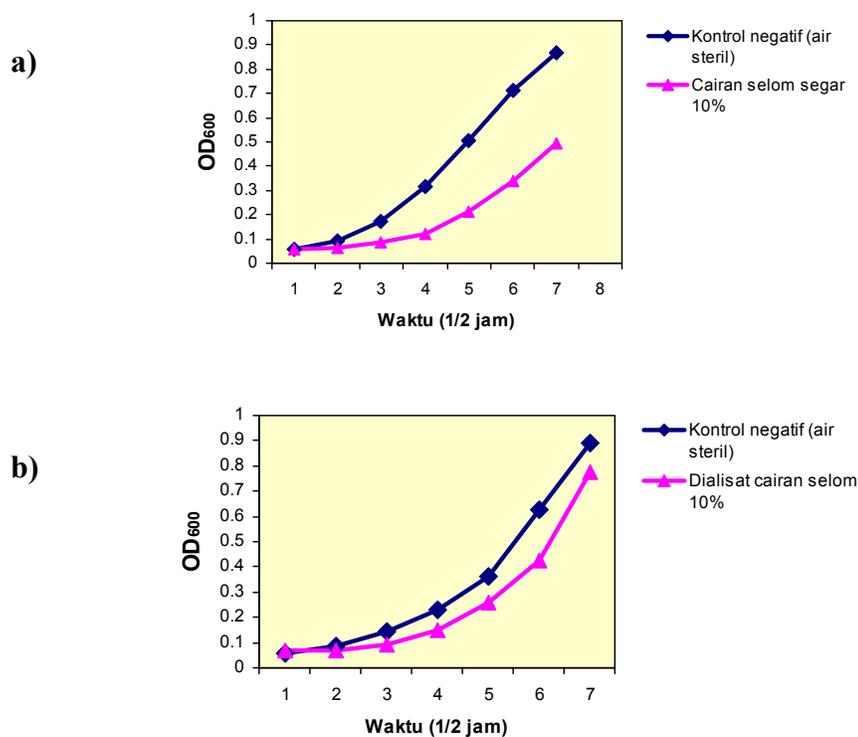
Materi dan Metoda

Uji aktivitas protein anti-Bacillus Megaterium dilakukan dengan cara kualitatif (zona bening) dan kuantitatif (spektroskopi, Optical Density). Beberapa variasi dilakukan untuk menguji kemampuan protein antibakteri ini. Pemisahan protein aktif antibakteri dengan yang tidak, dilakukan secara Kromatografi penukar anion (DEAE-agarosa).

Hasil dan Pembahasan

1. 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. 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 1.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 (contohnya, ada komponen molekul lain yang memiliki aktivitas 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.

2. Optimasi penyimpanan cairan selom

2.1 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.

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%.

2.2 Penyimpanan disuhu 4°C

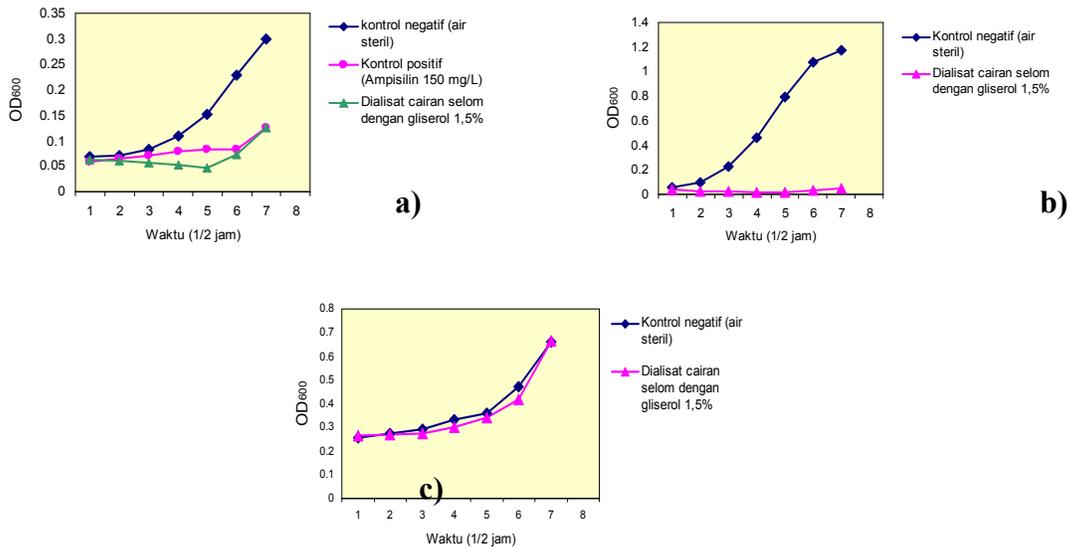
Penyimpanan cairan selom pada 4°C menunjukkan aktivitas yang cukup baik untuk masa penyimpanan yang tidak lama (1 hari). Penambahan gliserol 1,5% memberikan pengaruh terhadap aktivitas antibakteri cairan selom yang disimpan pada suhu ini. Cairan selom menunjukkan aktivitas antibakteri dihari ke-3 dan 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 2).

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. 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.



Gambar 2. 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.

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 osmosis. Kuatnya osmosis tergantung pada ukuran molekul dan konsentrasi osmolit. Hubungan energi bebas dengan perubahan volum dapat dijelaskan sebagai :

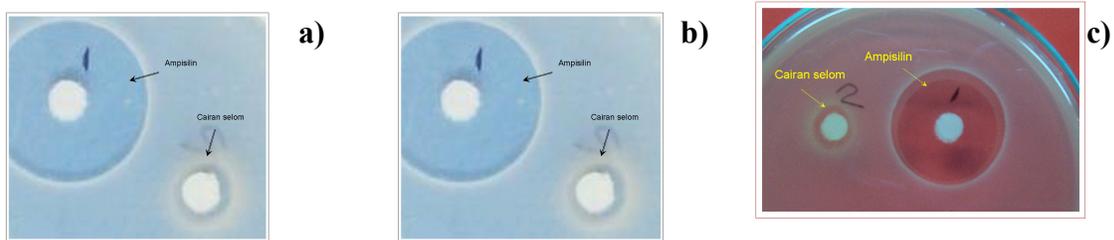
$$\Delta G = 0,234 \times \Delta V \times P_{1/2}$$

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.

3 Penyimpanan cairan selom di -20°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. 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 (Gambar 3). 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.

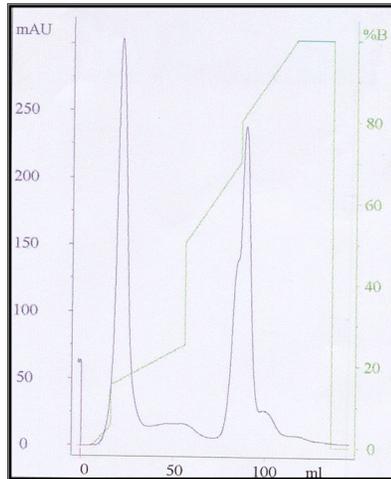


Gambar 3 Zona inhibisi cairan selom. (a) Setelah penyimpanan selama 87 hari pada suhu -20°C . (b) Setelah penyimpanan selama 107 hari pada suhu -20°C .

6.3 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 4). Fraksi ditampung secara selektif dan pengujian kualitatif (zona bening) membuktikan bahwa puncak pertama memiliki aktivitas antibakteri sementara puncak kedua tidak memiliki aktivitas antibakteri.



Gambar 4. Pemurnian cairan selom dengan kolom DEAE-sefarosa.

Hasil uji antibakteri cairan selom fraksi puncak I menunjukkan peningkatan inhibisi pertumbuhan *B. Megaterium*. 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.

BAB VII. KESIMPULAN

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

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

