

**THE ADDITION OF EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) WITH EGG WHITE
LYSOZYME EXTRACTS AS THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY ON *Salmonella sp* and
*Staphylococcus aureus***

Dilla Melani ¹, Lilik Eka Radiati ² dan Imam Thohari ²

¹*Student of Animal Husbandry Faculty, Brawijaya University, Malang*

²*Lecturer of Animal Husbandry Faculty, Brawijaya University, Malang*

ABSTRACT

The purpose of this research to find out the effect of lysozyme extract with EDTA as antimicrobial on *Salmonella sp* and *Staphylococcus aureus*. Benefits of this research was information the addition of EDTA to extract egg white lysozyme with the three concentrations. The research method was an experiment with 4 treatments of lysozyme with EDTA is 1:0,1:1,1:2,2:1 mg / ml . The measured variable was the growth area of the minimum inhibitory concentration of bacteria that exist around a paper disk diameter of clear area and acidity (pH) in the egg white lysozyme extraction materials . The addition of EDTA to extract egg white lysozyme can be used as an antimicrobial against *S. aureus* and *Salmonella sp* Based on the research conducted, the conclusion of this study is treatment at the level of acidity (pH) and concentration of salt type material effect on the extraction of egg white lysozyme . The addition of EDTA to extract egg white lysozyme can be used as an antimicrobial against *S. aureus* and *Salmonella sp* Based on the research conducted , it is suggested that in order to get the best inhibitory zone on the application of lysozyme extracts that have been added EDTA concentration can be done by giving 7 mg / ml . It is recommended that to get the best inhibitory zone on the application of lysozyme extracts that have been added EDTA concentration can be done by giving 7 mg / ml .

Keywords : *lysozyme, antimicrobial, microorganism*

**PENAMBAHAN EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) PADA EKSTRAK LISOZIM
PUTIH TELUR SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP *Salmonella sp* dan
*Staphylococcus aureus***

Dilla Melani ¹, Lilik Eka Radiati ² dan Imam Thohari ²

¹*Mahasiswa Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang*

²*Dosen Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH pada bahan ekstraksi lisozim putih telur sebagai antimikroba dan penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *Staphylococcus aureus*. Manfaat penelitian ini sebagai bahan informasi, masukan, dan dalam penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur dengan konsentrasi dan tingkat keasaman terbaik. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri uji *Salmonella sp* dan *S.aureus*. Metode penelitian adalah percobaan dengan 4 perlakuan lisozim dengan EDTA yaitu 1:0,1:1,1:2,2:1 mg/ml. Variabel yang diukur adalah daerah kadar hambat minimum pertumbuhan bakteri yang ada disekitar kertas *disk* berupa ukuran diameter daerah jernih dan tingkat keasaman (pH) pada bahan ekstraksi lisozim putih telur. Penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur mampu digunakan sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S.aureus* Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, Kesimpulan dari penelitian ini adalah Perlakuan pada tingkat keasaman (pH) dan konsentrasi jenis garam berpengaruh terhadap bahan ekstraksi lisozim putih telur. Penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur mampu digunakan sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S.aureus* Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, disarankan bahwa untuk mendapatkan zona hambat terbaik pada pengaplikasian ekstrak lisozim yang telah ditambahkan EDTA dapat dilakukan dengan pemberian konsentrasi 7 mg/ml. Disarankan bahwa untuk mendapatkan zona hambat terbaik pada pengaplikasian ekstrak lisozim yang telah ditambahkan EDTA dapat dilakukan dengan pemberian konsentrasi 7 mg/ml.

Keywords : *lisozim, antimikroba, mikroorganisme*

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Bahan makanan, selain merupakan sumber gizi bagi manusia juga merupakan sumber makanan bagi mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme dalam bahan pangan dapat menyebabkan perubahan yang menguntungkan seperti perbaikan bahan pangan secara gizi, daya cerna ataupun daya simpannya, selain itu pertumbuhan mikroorganisme dalam bahan pangan juga dapat mengakibatkan perubahan fisik atau kimia yang tidak layak dikonsumsi. Usaha untuk mencegah timbulnya kerusakan produk pangan pada umumnya menggunakan bahan pengawet alami.

Lisozim pada putih telur merupakan salah satu alternatif pengawet alami yang biasa digunakan untuk pengawetan makanan karena kemampuannya sebagai antibakteri. Lisozim merupakan enzim yang berukuran relatif kecil, berbentuk monomerik yaitu terdiri dari 129 asam amino dengan BM 14600 serta dapat menghidrolisis ikatan – 1,4 Nac-N- Asetil yang melisis sel bakteri gram positif, namun spektrum lisis dari lisozim hanya terbatas bekerja terhadap gram positif. Pemanfaatan lisozim agar dapat bekerja dengan efektif pada bakteri gram negatif, maka lisozim ditumbuhkan dengan bahan perusak membran seperti detergen dan *chelator*.

Bahan *chelator* yang biasa digunakan salah satunya adalah *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) yang mempunyai sifat antimikroba melalui penghambatan avabilitas kation dan dapat mendestabilisasi membran sel bakteri

melalui pembentukan kompleks kation divalent yang bekerja sebagai jembatan garam diantara membran mikromolekul, seperti lipopolisakarida yang banyak ditemukan di bakteri gram negatif. Perlakuan penambahan EDTA pada lisozim diharapkan bisa memperluas spektrum lisozim, sehingga lisozim tidak hanya bekerja pada bakteri gram positif tetapi juga pada gram negatif, hal ini yang mendasari pentingnya penelitian ini dilakukan dalam upaya mendapatkan informasi tentang kemampuan lisozim putih telur yang telah ditambahkan dengan EDTA sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S. aureus*.

Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh tingkat keasaman (pH) dan konsentrasi jenis garam terhadap bahan ekstraksi lisozim putih telur serta kemampuan penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S. aureus*.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat keasaman (pH) dan konsentrasi jenis garam terhadap bahan ekstraksi lisozim putih telur serta kemampuan penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S.aureus*.

MATERI DAN METODE

Materi

koloni bakteri *Salmonella sp* dan *S. aureus* didapat dari koleksi bakteri dari laboratorium LSIH-UB. eralatan pembuatan ekstraksi lizozim dengan EDTA: Erlemmeyer, gelas ukur, beaker glass, sentrifus dingin 6000 rpm, 16 menit, suhu 4⁰ Celcius ,pH meter ,cawan petri, pipet.

Metode

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan adalah Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, dengan cara menjelaskan uji kadar hambat minimum dengan pemberian perlakuan berbeda serta pengujian pH pada ekstraksi lizozim putih telur. Perlakuan dalam penelitian ini adalah perbandingan lizozim dengan EDTA 1:0 (L₀), 1:1(L₁), 1:2(L₂) dan 2:1(L₃) yang telah di *Freeze drying* kemudian diencerkan pada konsentrasi 5,7 dan 9 mg/ml.

Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu menentukan daerah hambatan pertumbuhan bakteri yang ada di sekitar kertas *disk* berupa ukuran diameter daerah jernih (Pelczar, 1988), nilai pH pada ekstraksi lizozim putih telur dan konsentrasi jenis garam terhadap kadar protein. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan Jangka Sorong dan pengukuran nilai pH menggunakan pH meter .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH Pada Bahan Ekstrak Lizozim Putih Telur terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella sp*

Hasil analisis nilai pH secara deskriptif menunjukkan bahwa ada kecenderungan perbedaan bahan ekstrak lizozim putih telur terhadap nilai pH. Data analisis nilai pH selengkapnya terdapat pada Lampiran 6 . Rata-rata nilai pH berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata nilai pH pada bahan ekstraksi lizozim putih telur

Perlakuan	Rata-rata ± sd
L ₀	2,48 ^a ± 0,03
L ₁	3,41 ^b ± 0,01
L ₂	3,53 ^b ± 0,23
L ₃	4,817 ^c ± 0,05

Tabel 2 menunjukkan besar nilai pH pada tiap perlakuan menunjukkan perbedaan sangat nyata. Tabel 2 menunjukkan pada L₀ 2,48 ± 0,03, pada L₁ nilai rata-rata 3,41 ± 0,01, pada L₂ nilai rata-rata 3,53 ± 0,23, sedangkan nilai rata-rata pada L₃ 4,817 ± 0,05. Perlakuan terbaik terdapat pada L₃ konsentrasi 9 mg/ml. Hal ini diduga tingkat keasaman merupakan faktor yang sangat mempengaruhi efektivitas senyawa antimikroba merupakan faktor yang sangat mempengaruhi efektivitas senyawa antimikroba. Sebagian besar senyawa antimikroba pangan merupakan asam-asam lemah yang efektif dalam bentuk tidak terdisosiasi karena dalam bentuk ini senyawa antimikroba tersebut dapat masuk

dalam membran sitoplasma mikroorganisme. Asam lemah dapat menurunkan pH sitoplasma, mempengaruhi struktur membran dan fluiditasnya serta mengkelat ion-ion dalam dinding sel bakteri. Penurunan pH sitoplasma akan mempengaruhi protein struktural sel, enzim, asam nukleat dan fosfolipid membran (Cotter *and* Hill, 2003).

Pertumbuhan mikroba dalam menghambat aktivitas antimikroba sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya dipengaruhi oleh tingkat keasaman (pH), suhu, protein, lemak, karbohidrat, aktivitas a_w , medium pertumbuhan bakteri serta dipengaruhi oleh konsentrasi garam (Brock *et al.*,1991). Mikroorganisme mempunyai kisaran pH tertentu dimana dapat tumbuh dan biasanya tumbuh pada pH optimum dimana bakteri dapat tumbuh dengan baik. Umumnya pada bakteri tumbuh baik pada kisaran pH 6,5-7,5. Terbentuknya asam laktat dan asam organik pada bakteri gram positif dapat menyebabkan penurunan pH, akibat mikroba yang tidak tahan terhadap kondisi pH yang relatif rendah sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat. Akumulasi produk akhir asam yang rendah, menghasilkan penghambatan yang luas terhadap gram positif maupun gram negatif. Penghambatan pertumbuhan pada mikroba disebabkan oleh asam organik akibat adanya pelepasan proton ke dalam sitoplasma sehingga pH dalam membran sel menjadi sangat asam secara tiba-tiba (Idris,1995).

Pengaruh Konsentrasi Garam terhadap Kadar Protein Ekstrak Lisozim Putih Telur

Hasil analisis nilai konsentrasi garam secara deskriptif menunjukkan bahwa ada kecenderungan perbedaan konsentrasi garam terhadap kadar protein ekstrak lisozim putih telur. Data analisis nilai kadar protein selengkapnya terdapat pada Lampiran 7. Rata-rata nilai konsentrasi berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata nilai konsentrasi terhadap kadar protein

Jenis Garam	Rata-rata Kadar Protein		
	0,1M	0,3M	0,5M
NH ₄ Cl	3,061±0,026	2,980±0,036	3,032±0,022

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada konsentrasi garam NH₄Cl 0,3 M menunjukkan konsentrasi terendah yaitu sebesar 2,980 dan konsentrasi garam NH₄Cl 0,1 M menunjukkan konsentrasi tertinggi sebesar 3,061. Hal ini diduga Ion garam yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah ion- ion garam akan melingkupi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini, sehingga protein melarut hal ini disebut *salting in*.(Chou *and* Chiang, 1998)

Jenis garam NH₄Cl memberikan penghambatan tertinggi terhadap bakteri gram positif. Konsentrasi garam juga mempengaruhi ekstraksi lisozim.. Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein. Interaksi diantara sesama molekul protein pada suasana *ionik* tinggi akan menurunkan kelarutan protein hal ini disebut *salting out* (Suryani, 2010).

Menurut Ibrahim *et al.*,(1991), bahwa bakteri gram positif mengandung 90 %

peptidoglikan serta lapisan tipis asam *teikoat* dan asam *teikuronat* yang bermuatan negatif. Sehingga diduga molekul ekstrak lisozim hasil perlakuan garam NH_4Cl (yang mempunyai aktivitas tinggi) akan berinteraksi kuat terhadap dinding sel positif yang menyebabkan *lisis*. Ditambahkan oleh Idris,(1995), bakteri gram positif memiliki satu lapisan tebal *peptidoglikan*, kepekaan suatu bakteri terhadap substrat antimikroba dipengaruhi oleh lapisan *peptidoglikan* yang menyusun dinding sel.

Pengaruh Penambahan EDTA pada Ekstrak Lisozim Putih Telur terhadap Zona Penghambatan *Staphylococcus aureus*

Hasil analisa secara deskriptif menunjukkan bahwa ada kecenderungan perbedaan diantara zona hambat terhadap pada *S. aureus*. Data analisis zona hambat terhadap pada *S. aureus* selengkapnya terdapat pada Lampiran 8 . Rata-rata nilai zona hambat terhadap pada *S. aureus* pada

Perlakuan	Konsentrasi (mg/ml)		
	5	7	9
L ₀	-	-	-
L ₁	-	-	-
L ₂	9,43 ± 0,32	9,30 ± 0,53	9,60 ± 0,26
L ₃	8,43 ± 0,45	10,13 ± 0,25	9,80 ± 0,40

berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai zona hambat (mm) terhadap pada *S. aureus*

Perlakuan L₀ dan L₁ tidak menghasilkan zona hambat, karena variasi konsentrasi yang digunakan menghasilkan respon yang berbeda-beda, ketika konsentrasi EDTA digunakan besar maka diameter zona hambat yang dihasilkan juga besar. Hasil penelitian ini masih berupa ekstrak lisozim sehingga belum murni lisozim yang dapat terjadi perubahan konformasi lisozim menjadi polimerik, baik berupa dimer atau trimer yang membuat spektrum lisozim lebih luas.

Hasil analisa deskriptif pada Tabel 2, bahwa pada perlakuan L₂ dengan konsentrasi 9 mg/ml terhadap *S. aureus* menghasilkan kekuatan antibakteri dengan kekuatan sedang karena zona hambat yang terbentuk sebesar 9,60 ± 0,26 mm. Berdasarkan Wiryawan *el al.* (2003), untuk ketentuan kekuatan antibakteri daerah hambatan 5-10 mm yaitu berkekuatan sedang. Kekuatan antibakteri terhadap *S. aureus* terjadi karena dinding sel gram positif dapat dirusak oleh lisozim dan EDTA yang terdapat pada putih telur serta lisozim merupakan suatu senyawa protein yang mempunyai sifat antimikroba yang dapat menghancurkan beberapa bakteri, sehingga dapat membantu untuk mencegah terjadinya kerusakan telur yang dikarenakan oleh aktivitas bakteri. Dinding sel bakteri gram positif hanya memiliki satu lapis yang tebal yaitu *peptidoglikan* yang merupakan polisakarida bersifat asam dan mengandung ulangan rantai gliserol atau ribitol dalam asam *teikoat* (Idris,1995).

Pengaruh Penambahan EDTA pada Ekstrak Lisozim Putih Telur terhadap Zona Penghambatan *Salmonella sp*

Hasil analisa secara deskriptif menunjukkan bahwa ada kecenderungan perbedaan diantara zona hambat terhadap pada *Salmonella sp.* Data, analisis zona hambat terhadap pada *Salmonella sp* selengkapnya terdapat pada Lampiran 9 . Rata-rata nilai zona hambat terhadap pada *Salmonella sp* pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Nilai zona hambat (mm) terhadap *Salmonella sp*

Perlakuan	Konsentrasi (ml/mg)		
	5	7	9
L ₀	-	-	-
L ₁	-	-	-
L ₂	9,12 ± 0,34	10,53 ± 0,53	9,11 ± 0,43
L ₃	8,08 ± 0,73	12,92 ± 0,21	9,20 ± 0,29

Perlakuan L₀ dan L₁ tidak menghasilkan zona hambat, karena bakteri gram negatif memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing yaitu pada lapisan lipopolisakarida (Branen and Davidson, 1993). Hasil penelitian ini masih berupa ekstrak lisozim sehingga belum murni lisozim yang dapat terjadi perubahan konformasi lisozim menjadi polimerik, baik berupa dimer atau trimer yang membuat spektrum lisozim lebih luas.

Hasil analisa deskriptif pada Tabel 4, bahwa pada perlakuan L₂ dengan konsentrasi 7 mg/ml terhadap *Salmonella sp* menghasilkan kekuatan antibakteri dengan kekuatan sedang karena zona hambat yang terbentuk sebesar 10,53 ± 0,53 mm. Berdasarkan Pelczar (1988), untuk ketentuan kekuatan antibakteri daerah

hambatan 5-10 mm yaitu berkekuatan sedang.

Kekuatan antibakteri terhadap *Salmonella sp* terjadi karena terdapat aktivitas bakterisidal lisozim terhadap bakteri gram negatif melalui perusakan fungsi antara gugus fosfat dari fosfolipid dengan lipopolisakarida di membran luar bakteri gram negatif (Ibrahim *et al.*, 1994). Ditambahkan oleh Lay dan Hastowo (1992), bahwa dinding sel bakteri Gram negatif merupakan struktur berlapis yaitu berupa lipoprotein, lipopolisakarida dan peptidoglikan.

KESIMPULAN

Perlakuan pada tingkat keasaman (pH) dan konsentrasi jenis garam berpengaruh terhadap bahan ekstraksi lisozim putih telur. Penambahan EDTA pada ekstrak lisozim putih telur mampu digunakan sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella sp* dan *S.aureus*

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini yang dilakukan disarankan bahwa untuk mendapatkan zona hambat terbaik pada pengaplikasian ekstrak lisozim yang telah ditambahkan EDTA dapat dilakukan dengan pemberian konsentrasi 7 mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A., Edward., G.H. Fleet., and M. Wooton, 1987. *Ilmu Pangan*. Terjemahan :Hari Purnomo dan Adiono. UI-Press. Jakarta.
- Idris, S., 1995. *Pengantar Teknologi Pengolahan Telur*. Penerbit Fajar. Malang.
- Pelczar, 1988. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. 809 – 812. UI Press, Jakarta.

Wiryawan, K.G., Tjakradiidjaja, A.S., Ratih,
A.M.R dan Janingrum, E.D.2003.
*Isolasi Bakteri asam laktat
penghasil antimikroba.*Jurnal
Veteriner.Vol 4:3.