

-1 A1 10000

-ADLN 10000

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Dis M03/05

Wal

p.

DISERTASI

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ANTIBAKTERI DARI CACING TANAH



**M I L I R
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

JOKO WALUYO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN ANTIBAKTERI DARI CACING TANAH

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Kamis
Tanggal : 07 Oktober 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB**




Oleh :

**JOKO WALUYO
NIM. 099813158 D**

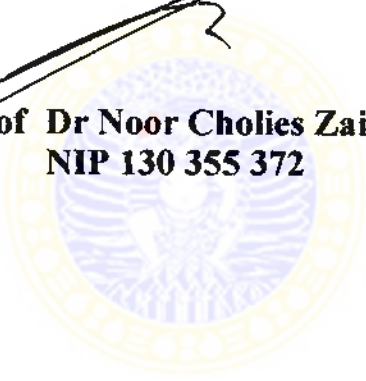
Lembar Pengesahan

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 14 Oktober 2004**


**Oleh
Promotor**



**Prof Dr Noor Cholies Zaini
NIP 130 355 372**



Ko Promotor I



**Dr Isnaeni, MS Apt
NIP 131 125 009**

Ko Promotor II



**Dr Bambang Sugiharto
NIP 131 131 021**

**Telah diuji pada
Tanggal 10 September 2004
PANITIA PENGUJI DISERTASI**

Ketua : Prof Dr H Muhamad Zainudin, Apt
Anggota : 1. Prof Dr Noor Cholies Zaini
2. Dr Isnaeni, M.S Apt
3. Dr Bambang Sugiharto
4. Prof dr Soebaktiningsih, DTM&H M.Sc SpPark
5. Dr Eddy Bagus Wasito, dr MS SpMK
6. Dr rer Nat Mulja Hadi Santosa, Apt



**Sesuai Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 7123/J03/PP/2004
Tanggal : 23 September 2004**

UCAPAN TERIMA KASIH

Rasa syukur dan harapan ridho semata-mata hanya penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena sesungguhnya hanya dengan limpahan rahmat dan karunia Allah Yang Maha Pengasih, maka serangkaian penelitian dan penulisan disertasi ini dapat penulis selesaikan.

Atas peran para pembimbing secara terpadu dan sumbangsih dari berbagai pihak, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya juga kepada semua pihak atas bantuan yang telah diberikan.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga disampaikan kepada :

Prof Dr Noor Cholies Zaini Sebagai promotor telah menghantarkan penulis melewati jenjang pendidikan tertinggi, beliau telah membimbing, memberi petunjuk dan dorongan moral, menumbuhkan rasa percaya diri dan merubah "attitude" saya serta semangat yang tidak henti-hentinya atas ilmu pengetahuan yang penulis tekuni, sehingga sampai terselesainya penyusunan disertasi ini.

Dr Isnaeni, MS, Apt Selaku ko-promotor I, yang telah memotivasi, melatih ketrampilan dalam bidang mikrobiologi dan memberi asupan keilmuan serta tata tulis, sehingga menghantarkan keberhasilan penulis menjalani pendidikan ini.

Dr Bambang Sugiharto Selaku ko-promotor II, dan Kepala pusat penelitian Biologi Molekul Universitas Jember, yang telah membimbing dalam melakukan isolasi, purifikasi dan karakterisasi protein antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini dan memberikan wacana dan wawasan berpikir secara runtut dan rasional dalam mengerjakan penelitian. beliau mengarahkan, mendampingi dan memberi petunjuk pelaksanaan penelitian di laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember. Beliau juga memberikan tata cara penulisan Disertasi.

Prof Dr Med H Puruhito, dr Sp.B selaku Rektor Universitas Airlangga dan **Prof H Soedarto, dr DTM&H Ph.D** mantan Rektor Universitas Airlangga yang telah mengizinkan penulis mengikuti pendidikan program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof Dr H Muhammad Amien, dr Sp.P Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, beserta **seluruh pimpinan** Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang memberikan kesempatan menimba ilmu dan bersosialisasi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof Dr Hj Suhariningsih, Ir Ketua Program Studi MIPA Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Atas segala perhatian dan dukungannya dalam membantu memperlancar proses akademik selama mengikuti pendidikan program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof Dr H Muhamad Zainudin Selaku konsultan di bidang Statistik, memberikan masukan, arahan dan wacana berpikir secara runtut. Dengan segala kesabarannya membantu memperlancar penyelesaian pendidikan di Program Doktor ini.

Prof dr Soebaktiningsih DTM&H, M.Sc SpParK Sebagai penguji dan tatacara penulisan dalam penyusunan disertasi. Beliau juga memberi wawasan dan membangkitkan semangat disaat penulis terbentur dengan masalah-masalah yang berkaitan dengan hasil penelitian.

Dr Eddy Bagus Wasito, dr MS SpMK Selaku konsultan di bidang mikrobiologi, melatih ketrampilan dan cara kerja di bidang mikrobiologi, mengingatkan, memotivasi dan dengan kesabarannya beliau senantiasa memberikan masukan-masukan yang sangat berarti dalam substansi keilmuan, sehingga memberikan nilai tambah dalam serangkaian proses penyusunan disertasi ini.

Dr rer Nat Mulja Hadi Santosa, Apt Selaku konsultan di bidang analisis asam amino. Dengan kearifannya memberikan asupan keilmuan, pengarahan dan bimbingannya tentang teknik-teknik penulisan.

Rektor beserta **Pembantu Rektor** Universitas Jember yang memberikan dukungan moril dan materiil semasa pendidikan program Doktor di Universitas Airlangga.

Dekan beserta **Pembantu Dekan** Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember, atas segala dukungan, perhatian dan bantuan baik moril maupun materiil.

Teman-teman sejawat di Jurusan Pendidikan MIPA Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan tanpa terkecuali, terutama para **sejawat di Program Pendidikan Biologi** Universitas Jember yang senantiasa memotivasi penulis untuk menyelesaikan pendidikan program Doktor.

Penulis sampaikan rasa terima kasih atas keakraban yang terjalin selama ini, terutama kepada **teman-teman S-3 Program Studi MIPA Universitas Airlangga angkatan tahun 1998/1999.**

Selanjutnya, ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada teman-teman di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember diantaranya : **Dr Ir Tri Agus Siswoyo, M.Sc, Dr Didik Puji Restanto, Ir Miswar, M.Si, Ir Yudi, M.Si, Ir Arin MS dan Dr Evi Hanizar** yang telah membantu dan memberi masukan dalam penelitian ini, sehingga membantu penyelesaian disertasi ini.

Tumbuh menjadi besar dan berkembang menjadi dewasa, karena belaian kasih sayang dan tuntunan ayahanda **Prpto Suwarno** dan Ibunda **Sridadi**, serta Ayah dan Ibu mertua **S. Hadimidjono, BA dan Ismiyatun** almarhum. Sujud bakti dan terima kasih ananda atas segala curahan kasih dan doa restunya, terutama di saat-saat ananda menjalani tahap-tahap ujian, sehingga ananda bisa berada di jenjang keberhasilan saat ini.

Kakak-kakakku dan adik-adikku terkasih, kebanggaan dan harapan kalian menjadi motivator tersendiri dalam menyelesaikan studi ini. Untuk itu semua kusampaikan rasa terima kasihku.

Di antara rangkaian ungkapan terima kasih ke semua pihak, orang-orang terdekat dengan penulis adalah yang utama, Istri tercinta **Dr Dwi Wahyuni, Dra M.Kes** dan kedua putraku : **Prakosa Danu Wijoko Waluya** dan **Danar Agung Nugroho Waluya**. Karena mereka dan untuk merekalah keberhasilan ini. Kusampaikan terima kasih atas pengorbanan, pengertian, doa dan kasih sayangmu yang besar. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rakhmat dan hidayah Nya kepada kita semua. Amin.

RINGKASAN

Purifikasi dan Karakterisasi Protein Antibakteri dari Cacing Tanah

Joko Waluyo

Cacing tanah yang terdapat di Indonesia bermacam-macam famili, yaitu famili *Enchytraeidae*, *Moniligastridae*, *Octochaetidae*, *Glossoscolecidae*, *Megascolecidae* dan *Lumbricidae*. Cacing tanah yang terbanyak ditemukan di Pulau Jawa adalah cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pontoscolex corethrurus* dan *Pheretima capensis*. *Pheretima javanica* termasuk dalam famili *Megascolecidae* dan mempunyai tubuh yang besar serta panjang dibanding cacing tanah yang lain (Waluyo, 1993).

Beberapa penelitian telah membuktikan adanya daya antibakteri dari protein hasil ekstraksi cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima sp.* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* (Affandi, 1996; Muliasari, 1996). Ju Hyun dkk. (1998) berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi peptida antimikroba dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan disebut *lumbricin I*. *Lumbricin I* merupakan peptida antimikroba yang mengandung asam amino prolin 15 % dari total berat kering dan mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Selain itu, Milochau dkk. (1997) juga telah mengisolasi dan mengkarakterisasi protein antibakteri dari cairan *coelomic* cacing tanah *Eisenia fetida andrei* yang mempunyai aktivitas antibakteri dan diberi nama *fetidin* dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0 kDa. Selain itu cacing tanah digunakan oleh masyarakat untuk obat tipus.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan menguji ekstrak protein cacing tanah di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa yang berpotensi sebagai antibakteri, dilanjutkan isolasi dan karakterisasi protein antibakteri cacing tanah. Selain itu penelitian juga ditujukan untuk menentukan konsentrasi hambatan minimum dan uji sifat kerja protein antibakteri cacing tanah terhadap bakteri uji.

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan protein murni dari cacing tanah yang bersifat antibakteri, sebagai dasar untuk pengembangan penelitian lebih lanjut dalam penggandaan protein murni dengan bioteknologi. Selanjutnya diharapkan dapat dikembangkan sebagai bahan pembuatan obat alternatif penyakit tipus dan infeksi oleh bakteri lain, sehingga akan membuka wawasan baru dalam upaya pemanfaatan bahan alam secara optimal.

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan: (1) Identifikasi cacing tanah; (2) Pembuatan ekstrak cacing tanah dalam tiga macam pelarut yaitu: 0,50mM MOPS, 0,9 NaCl, bufer fosfat; (3) Uji aktivitas ekstrak cacing tanah; (4) Purifikasi protein antibakteri menggunakan kromatografi kolom *Anion Exchanger* dan gel filtrasi serta pemurnian dengan Native-polyacrilamide gel elektroforesis; (5) Penentuan konsentrasi hambatan minimal protein antibakteri; (6) Karakterisasi protein antibakteri meliputi berat molekul, kandungan asam amino, pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas protein antibakteri; (7) Uji sifat kerja protein antibakteri.

Hasil uji daya antibakteri menunjukkan bahwa ke tiga cacing tanah yang diteliti semua mengandung protein antibakteri. Ekstrak *Pheretima javanica* menunjukkan aktivitas lebih tinggi dibandingkan ekstrak *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrurus*, diameter zona hambatan masing-masing sebesar antara 10,0-14,0 mm; 6,5-9,0 mm; 7,0-10,0 mm. Dibanding pelarut lain bufer MOPS paling tepat untuk pelarut protein. Fraksinasi protein *Pheretima javanica* dalam pelarut MOPS dengan kromatografi DEAE dihasilkan tiga puncak kelompok protein pada pengukuran dengan spektrofotometri (λ 280). Puncak kelompok protein ketiga mempunyai aktivitas antibakteri, dan terelusi dalam kolom DEAE dengan gradien konsentrasi 0,380 M NaCl. Protein aktif difraksinasi lebih lanjut menggunakan kromatografi filtrasi dan menghasilkan dua puncak kelompok protein. Hasil analisis dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa puncak pertama mempunyai berat molekul 66,0 kDa-150,0 kDa dan puncak kedua mempunyai berat molekul 7,0 kDa-55,0 kDa. Hasil uji aktivitas menyatakan bahwa puncak kedua mempunyai aktivitas antibakteri. Puncak protein kedua kemudian dimurnikan dengan Native-PAGE dan dihasilkan tujuh macam pita protein. Hasil uji aktivitas terhadap masing-masing pita menunjukan bahwa pita protein no.6 mempunyai aktivitas antibakteri. Protein tersebut mempunyai konsentrasi hambatan minimum terhadap bakteri Gram negatif: *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, berturut-turut sebesar 40,0 $\mu\text{g/mL}$, 40,0 $\mu\text{g/mL}$, 20,0 $\mu\text{g/mL}$, dan Gram positif: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 20,0 $\mu\text{g/mL}$, 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Hasil karakterisasi berat molekul dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pita protein no.6 (aktif) mengandung dua macam pita protein dengan berat molekul 31,0 kDa dan 34,0 kDa. Hasil analisis asam amino protein no.6 mengandung hidrokisprolin (19,04%). Uji aktivitas antibakteri masih mempunyai aktivitas sampai suhu 75°C dan mempunyai pH optimum 7. Protein antibakteri *Pheretima javanica* mempunyai sifat kerja antibakteri sebagai bakteriostatik.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar bagi peneitian lanjutan, terkait dengan protein antibakteri dari cacing tanah. Oleh karena itu disarankan untuk penelitian lebih lanjut dalam melakukan kloning DNA dari protein antibakteri *Pheretima javanica* dan penerapan obat alternatif.

SUMMARY**Purification and Characterization of Antibacterial Protein from Earthworms****Joko Waluyo**

There are many kind of earthworm family in Indonesia i.e.: *Enchytraeidae*, *Moniligastridae*, *Octochaetidae*, *Glossoscolecidae*, *Megascolecidae*, and *Lumbricidae*. The Species of earthworm commonly found in Java are *Pheretima javanica*, *Pontoscolex corethrurus*, and *Pheretima capensis*. *Pheretima javanica* is the member of *Megascolecidae* family. They have a big and long body compared to the others (Waluyo, 1994).

Several research have proved that there are antibacterial activities from earthworm extract of *Lumbricus rubellus* and *Pheretima sp.*; which can inhibit the growth of Gram negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Stapilococcus aureus* and *Salmonella typhi* (Affandi, 1996 and Muliasari, 1996).

Ju Hyun, et. al (1998) succeeds to isolate and characterize antimicrobial of *Lumbricus rubellus* extract and it was called *lumbricin 1*. It contains amino acid proline about 15% (w/dry weight) and has molecular weight 7.231 kDa. Milochau et. al (1997) isolated and characterized antibacterial protein from coelomic liquid of *Eisenia fetida adrei* that has an antibacterial activity. It is called *fetidin*; which has molecular weight 40,0 kDa and 45,0 kDa.

This research has been conducted to prove that the protein extract from three species of earthworms have an antibacterial potencies. Isolation and characterization of the antibacterial protein and also their Minimum Inhibition Concentration have been performed.

The aim of this research is to find out a pure protein from earthworms; which has antibacterial activities. Results of research are expected produced novel issues in term of multiply the protein by genetic engineering. On the other hand, it can be developed as the basic materials of alternative medicine for typhoid and other infection caused by bacteria. Therefore, it will contribute a new concept for utilization of natural product.

The research has been conducted in several stages, namely (1) Earthworm determination, (2) Extraction earthworm by using three kinds of solvents, (3) Antibacterial activity test of earthworm extract by agar diffusion method, (4) Purification of antibacterial protein by using DEAE chromatography (anion exchanger), filtration column chromatography, and Native-PAGE, (5) Determination of Minimum Inhibition Concentration of antibacterial protein, (6) Characterization of antibacterial protein including determination of molecular weight, amino acid content, effect of temperature and optimum pH, and (7) The tests of antibacterial protein activity.

The results showed that three species of earthworms contained antibacterial protein. The activity of antibacterial extract of *Pheretima javanica* in MOPS solvent was higher than extract of *Pheretima capensis* and

Pontoscolex corethrurus, inhibition zone diameter each of among 10,0-14,0 mm, 6,5-9,0 mm, 7,0-10,0 mm. Compared to other solvent of MOPS buffer most precise for the solvent of protein. Then the extract of *Pheretima javanica* with MOPS solvent was fractionated by using DEAE chromatography (anion exchanger) produced three peaks of protein group; the last peak need 0,380 M NaCl concentration gradient. One of the fractions has antibacterial activity; by using filtration chromatography produced two peaks. The first peak had a molecular weight 66,0 kDa-150,0 kDa, and the second peak had a molecular weight 7,0 kDa-55,0 kDa, after tested the second peak had antibacterial activities. Further purification that carried out by cutting the active fraction of second protein peak by using Native-PAGE produced seven bands. The sixth band has antibacterial activity. The Minimum Inhibition Concentration of Gram negative bacteria *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* and Gram positive bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* was 40,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 20,0 µg/mL and 10,0 µg/mL respectively. The sixth protein band had characteristic in molecular weight 31,0 kDa and 34,0 kDa. It contains 19.04% hydroxyproline, and has showed heat resistance at 75⁰ C. The protein active of *Pheretima javanica* is a bacteriostatic.

The result of this research expected to be useful for further research in relation to antibacterial protein from earthworms. Therefore, it is recommended to conduct further research on cloning and applying alternative drug.



ABSTRACT**Purification and Characterization of Antibacterial Protein from Earthworms****Joko Waluyo**

This research has been conducted to prove that the protein extract from three species of earthworms have an antibacterial potencies. Isolation and characterization of the antibacterial protein and the Minimum Inhibition Concentration have been done.

The research has been conducted in several stages, namely (1) Earthworm determination, (2) Extraction earthworm by using three kinds of solvents, (3) Antibacterial activity test of earthworm extract by agar diffusion method, (4) Purification of antibacterial protein by using DEAE chromatography (anion exchanger), filtration column chromatography, and Native-PAGE, (5) Determination of Minimum Inhibition Concentration of antibacterial protein, (6) Characterization of antibacterial protein including determination of molecular weight, amino acid content, effect of temperature and optimum pH, and (7) The test of antibacterial protein activity.

The results showed that three species of earthworms contained antibacterial protein. The activity of antibacterial extract of *Pheretima javanica* in MOPS solvent was higher than extract of *Pheretima capensis* and *Pontoscolex corethrurus*, inhibition zone diameter each of among 10,0-14,0 mm, 6,5-9,0 mm, 7,0-10,0 mm. Compared to other solvent of MOPS buffer most precise for the solvent of protein. Then the extract of *Pheretima javanica* with MOPS solvent was fractionated by using DEAE chromatography (anion exchanger) produced three peaks of protein group; the last peak need 0,380 M NaCl concentration gradient. One of the fractions has antibacterial activity; by using filtration chromatography produced two peaks. The first peak had a molecular weight 66,0 kDa-150,0 kDa, and the second peak had a molecular weight 7,0 kDa-55,0 kDa, after tested the second peak had antibacterial activities. Further purification that carried out by cutting the active fraction of second protein peak by using Native-PAGE produced seven bands. The sixth band has antibacterial activity. The Minimum Inhibition Concentration of Gram negative bacteria *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* and Gram positive bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* was 40,0 µg/mL, 40,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 20,0 µg/mL and 10,0 µg/mL respectively. The sixth protein band had characteristic in molecular weight 31,0 kDa and 34,0 kDa. It contains 19.04% hydroxyproline, and has showed heat resistance at 75^o C. The protein active of *Pheretima javanica* is a bacteriostatic.

Key words: Earthworms *Pheretima javanica*, *Pontoscolex corethrurus*, *Pheretima capensis*, antibacterial protein, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*.

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Persyaratan Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Ucapan Terima Kasih.....	v
Ringkasan.....	viii
Summary	x
Abstrak.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penyebaran Cacing Tanah	6
2.2 Fisiologi Cacing Tanah	7
2.3 Sistem Reproduksi Cacing Tanah.....	8
2.4 Habitat dan Lingkungan Cacing Tanah	9
2.4.1 Pengaruh keasaman	9
2.4.2 Pengaruh kandungan bahan organik	10
2.4.3 Pengaruh air	10
2.4.4 Pengaruh suhu	11
2.4.5 Pengaruh vegetasi	12
2.4.6 Pengaruh tipe tanah	13
2.4.7 Pengaruh ketinggian	13
2.5 Kandungan Zat dalam Cacing Tanah	14
2.6 Manfaat Cacing Tanah	15
2.7 Tinjauan Tentang Protein Antibakteri	18
2.8 Antibiotika	19
2.8.1 Sumber antibiotika	20
2.8.2 Manfaat antibiotika	20
2.8.3 Mekanisme kerja antibiotika	20
2.8.4 Spektrum antibiotik	26

2.9 Mekanisme Kerja Protein Antibakteri	27
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL	29
3.1 Kerangka Konseptual	29
3.2 Hipotesis	32
BAB 4. METODE PENELITIAN	33
4.1 Rancangan Penelitian	33
4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel	33
4.3 Definisi operasional variabel	34
4.4 Bahan Penelitian	34
4.5 Instrumen Penelitian	35
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.7 Prosedur Kerja	36
4.7.1 Identifikasi cacing tanah	36
4.7.2 Pembuatan ekstrak cacing tanah	38
4.7.3 Uji aktivitas antibakteri ekstrak dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri	38
4.7.4 Purifikasi protein dari cacing tanah	40
4.7.4.1 Fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom DEAE Cephacel (<i>Anion Exchanger</i>)	40
4.7.4.2 Fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 (Filtrasi)	41
4.7.4.3 Pemurnian protein dari cacing tanah dengan Native- PAGE	41
4.7.5 Uji aktivitas protein murni dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri	41
4.7.6 Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum protein antibakteri dari cacing tanah terhadap bakteri uji	42
4.7.7 Karakterisasi protein antibakteri dari cacing tanah	42
4.7.7.1 Penentuan berat molekul protein antibakteri dari cacing tanah dengan SDS-PAGE	42
4.7.7.2 Analisis asam amino protein dari cacing tanah dengan <i>Amino Acid Analyzer</i>	45
4.7.7.3 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah.....	46
4.7.7.4 Pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah	47
4.7.7.5 Pengaruh protein antibakteri dari cacing tanah terhadap kurva pertumbuhan bakteri uji	47
BAB 5 HASIL PENELITIAN	48
5.1 Identifikasi Cacing Tanah	48
5.1.1 Identifikasi <i>Pheretima javanica</i> (Kinberg)	48
5.1.2 Identifikasi <i>Pontoscolex coretrurus</i> (Fr.Mull.)	51
5.1.3 Identifikasi <i>Pheretima capensis</i> (Horst)	52

5.2 Hasil Pembuatan Ekstrak Protein Dari Cacing Tanah	54
5.3 Uji Aktivitas Ekstrak Protein Dari Cacing Tanah yang Berpotensi Sebagai Antibakteri	55
5.4 Purifikasi Protein Dari Cacing Tanah yang berpotensi sebagai antibakteri.....	57
5.4.1 Fraksinasi protein dari cacing tanah dengan Kromatografi Kolom DEAE Sephacel (<i>Anion Exchanger</i>)	57
5.4.2 Fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom Sephadex G100 (Filtrasi)	60
5.4.3 Pemurnian protein dari cacing tanah dengan Native-PAGE...	63
5.5 Uji Aktivitas Protein Dari Cacing Tanah yang Berpotensi Sebagai Antibakteri	64
5.6 Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Protein Antibakteri dari cacing tanah Terhadap Bakteri Uji	65
5.7 Karakterisasi Protein Antibakteri dari cacing tanah	68
5.7.1 Penentuan berat molekul protein antibakteri dari cacing tanah dengan SDS-PAGE.....	68
5.7.2 Analisis asam amino protein dari cacing tanah dengan <i>Amino Acid Analyzer</i>	69
5.7.3 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah	70
5.7.4 Pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah.....	72
5.7.5 Pertumbuhan bakteri uji dengan dan tanpa protein antibakteri	74
5.7.5.1 Pertumbuhan <i>S. Typhi</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	74
5.7.5.2 Pertumbuhan <i>S. dysenteriae</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	74
5.7.5.3 Pertumbuhan <i>E. coli</i> dengan dan tanpa protein antibakteri ..	76
5.7.5.4 Pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	77
5.7.5.5 Pertumbuhan <i>B. Subtilis</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	78
BAB 6. PEMBAHASAN	80
6.1 Identifikasi Cacing Tanah	80
6.2 Uji Aktivitas Ekstrak Cacing Tanah dalam Berbagai Pelarut yang Berpotensi Sebagai Antibakteri	81
6.3 Fraksinasi Protein dari cacing tanah dengan Kromatografi Kolom DEAE Sephacel (<i>Anion Exchanger</i>)	82
6.4 Fraksinasi Protein Dari Cacing Tanah dengan Kromatografi Kolom Sephadex G-100 (Filtrasi).....	84
6.5 Pemurnian Protein Dari Cacing Tanah dengan Native-PAGE	85
6.6 Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah Terhadap Bakteri Uji	85

6.7 Karakterisasi Berat Molekul Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah dengan SDS-PAGE	86
6.8 Analisis Kandungan Asam Amino Protein Dari Cacing Tanah Dengan <i>Amino Acid Analyzer</i>	87
6.9 Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah	89
6.10 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah.....	90
6.11 Pengaruh protein antibakteri dari cacing tanah terhadap pertumbuhan bakteri uji	90
BAB 7. PENUTUP	93
7.1 Kesimpulan	93
7.2 Saran	94
Daftar Pustaka	95
Lampiran	99



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1: Ekstrak protein dari tiga jenis cacing tanah <i>L.rubellus</i> , <i>P.Javanica</i> , <i>P.corethrurus</i> dengan pelarut 0,9% NaCl; 0,5 mM MOPS; bufer fosfat pH 7,2	54
Tabel 5.2 : Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak protein dari cacing tanah dengan metode difusi agar	56
Tabel 5.3 : Hasil fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom DEAE dan pengukuran kandungan protein tiap fraksi dengan spektrofotometer serta uji aktivitas dengan metode difusi agar	58
Tabel 5.4 : Hasil fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom filtrasi dan pengukuran kandungan protein tiap fraksi dengan spektrofotometer serta uji aktivitas dengan metode difusi agar	61
Tabel 5.5 : Uji aktivitas antibakteri protein dari cacing tanah hasil pemurnian dengan native-PAGE	65
Tabel 5.6 : Hasil penentuan konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri dari <i>Pheretima Javanica</i> terhadap bakteri uji masing-masing sebesar	67
Tabel 5.7: Hasil analisis kandungan asam amino protein antibakteri dalam persen (%) Berat kering/Berat kering	69
Tabel 5.8 : Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari <i>Pheretima Javanica</i> terhadap lima macam bakteri uji	71
Tabel 5.9 : Pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari <i>Pheretima Javanica</i>	73

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Model mekanisme kerja peptida antibakteri dengan cara menghambat atau membunuh bakteri patogen	28
Gambar 3.1 : Diagram Kerangka Konseptual	31
Gambar 4.1 : Bagan kerangka operasional	37
Gambar 5.1 : Morfologi <i>Pheretima javanica</i> yang digunakan dalam penelitian	49
Gambar 5.2 : Anatomi <i>Pheretima javanica</i> yang digunakan dalam Penelitian	50
Gambar 5.3 : Morfologi <i>Pontoscolex corethrurus</i> yang digunakan dalam penelitian	52
Gambar 5.4 : Morfologi <i>Lumbricus rubellus</i> yang digunakan dalam penelitian	53
Gambar 5.5 : Uji aktivitas antibakteri ekstrak dari cacing tanah dengan metode difusi agar (tiap sumur berisi 40 µl ekstrak cacing tanah)	55
Gambar 5.6 : Fraksinasi protein <i>Pheretima javanica</i> menggunakan kromatografi kolom DEAE, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbannya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm beserta aktivitasnya dengan difusi agar pada media nutrisi	59
Gambar 5.7 : Fraksinasi protein <i>Pheretima javanica</i> menggunakan kromatografi kolom Sephadex G-100, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbannya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm beserta aktivitasnya dengan difusi agar pada media nutrisi	62
Gambar 5.8 : Hasil pemurnian protein <i>Pheretima javanica</i> dengan elektroforesis Native-PAGE	63
Gambar 5.9 : Uji aktivitas antibakteri protein hasil pemisahan native-PAGE pada media nutrisi	64
Gambar 5.10 : Uji penentuan konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri dari <i>Pheretima javanica</i> terhadap bakteri uji pada media agar nutrisi	66
Gambar 5.11 : Hasil karakterisasi berat molekul protein antibakteri dari <i>Pheretima javanica</i> dengan SDS-PAGE (12,5 % akrilamid).....	68
Gambar 5.12 : Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari <i>Pheretima javanica</i>	70

Gambar 5.13 : Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari <i>Pheretima javanica</i> pada lima macam bakteri uji.....	72
Gambar 5.14 : Grafik pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari <i>Pheretima javanica</i> dan bufer MOPS sebagai kontrol...	73
Gambar 5.15 : Kurva pertumbuhan <i>Salmonella typhi</i> pada media cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm	75
Gambar 5.16 : Kurva pertumbuhan <i>S dysenteriae</i> pada media cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm	76
Gambar 5.17 : Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i> pada media cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.....	77
Gambar 5.18 : Kurva pertumbuhan <i>P. aeruginosa</i> pada media cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.....	78
Gambar 5.19 : Kurva pertumbuhan <i>B. Subtilis</i> pada media cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.....	79

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. identifikasi cacing tanah	99
Lampiran 2. Hasil analisis kadar asam amino dalam % B/B	100
Lampiran 3. Perhitungan luas daerah di bawah kurva (AUC) pada pertumbuhan <i>S. typhi</i> dengan dan tanpa protein antibakteri .	101
Lampiran 4. Perhitungan luas daerah di bawah kurva (AUC) pada pertumbuhan <i>S. dysenteriae</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	102
Lampiran 5. Perhitungan luas daerah di bawah kurva (AUC) pada pertumbuhan <i>E. coli</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	103
Lampiran 6. Perhitungan luas daerah di bawah kurva (AUC) pada pertumbuhan <i>P.aeruginosa</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	104
Lampiran 7. Perhitungan luas daerah di bawah kurva (AUC) pada pertumbuhan <i>B. subtilis</i> dengan dan tanpa protein antibakteri	105
Lampiran 8. Uji perbedaan pertumbuhan bakteri uji dengan dan tanpa protein antibakteri pada pengamatan jam ke 2–14 dengan Uji T	106
Lampiran 9. Uji perbedaan pertumbuhan bakteri uji dengan dan tanpa protein antibakteri pada pengamatan jam ke 14 – 24 dengan Uji T	107

DAFTAR SINGKATAN

MOPS : Morpholinopropanesulfonic acid

KHM : Konsentrasi hambatan minimum

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel elektroforesis

kDa : Kilo dalton

KK : Kromatografi kolom

BM : Berat molekul

AAA : Analisis asam amino

DEAE : Deethylaminoethyl

TEMED: N.N.N'.N'.-Tetramethylenediamine

CBB : Coosmosic brilliant blue

APS : Amonium PerSulfate

ppm : Part per million

PR : Prolin Arginin

PABA : p-aminobenzoat

ATP : Adenosin trifosfat

PAS : p-aminosalisilat

TMS : tetrametilsilan

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Lebih kurang 1.800 jenis cacing tanah tersebar di seluruh dunia (Edwards dan Lofty, 1972). Cacing tanah yang tersebar di Indonesia tergolong dalam famili *Enchytraeidae*, *Moniligastridae*, *Octochaetidae*, *Glossoscolecidae*, *Lumbricidae* dan *Megascolecidae*. Jenis cacing tanah yang banyak ditemukan di Pulau Jawa antara lain jenis *Pontoscolex coretrurus*, *Pheretima capensis* dan *Pheretima javanica*. Di antara ketiga cacing tanah tersebut yang paling banyak jumlah populasinya adalah *Pheretima javanica* dan mempunyai tubuh relatif lebih besar dan panjang di antara cacing tanah yang lain (Waluyo, 1994). *Pheretima javanica* berwarna kehitaman, panjang 145mm-190mm termasuk dalam famili *Megascolecidae*. Sedangkan *Pheretima capensis* bagian dorsal berwarna coklat tua dan bagian ventral berwarna coklat muda, panjang 110mm-167mm, termasuk famili *Megascolecidae*. Selanjutnya *Pontoscolex coretrurus* berwarna keputih putihan dengan sedikit kecoklatan, bagian kepala kemerahan, panjang antara 55mm-90mm, termasuk dalam famili *Glossoscolecidae*.

Secara umum tubuh cacing tanah mengandung protein, asam amino dan bermacam-macam enzim. Beberapa penelitian juga telah membuktikan adanya daya antibakteri ekstrak protein cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima sp.* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* dan *Saimonella typhi* (Affandi, 1996; Muliasari, 1996).

Ekstrak rebusan *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima sp* mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* (Ratningsih dan Rustama, 1998). Ekstrak air *Pheretima sp.* yang dipanaskan selama 5 menit menunjukkan pengaruh lebih kecil dibanding ekstrak yang tidak dipanaskan terhadap pertumbuhan *Salmonella sp.* (Masniari dkk. 1999). Lebih lanjut ekstrak *Lumbricus rubellus* mampu menghambat pertumbuhan dan membunuh bermacam-macam mikroorganisme yang tergolong dalam famili *Enterobacteriaceae*. Ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai obat penyakit infeksi yang disebabkan oleh berbagai mikroorganisme patogen (Rositawati 1999).

Ju Hyun dkk. (1998) mengemukakan bahwa peptida antimikroba dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi disebut *lumbricin I*. *Lumbricin I* merupakan peptida antimikroba yang mengandung prolin 15% dari total berat kering, dan tersusun dari 62 macam asam amino serta mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Selain itu, Milochau dkk. (1997) juga telah mengisolasi dan mengkarakterisasi protein antibakteri dari cairan *coelomic* dari cacing tanah *Eisenia fetida andrei*, yang mempunyai aktivitas antibakteri dan diberi nama *fetidin* dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0kDa. Secara empiris terbukti bahwa cacing tanah sering digunakan oleh masyarakat untuk obat tipus.

Sejauh ini belum ada laporan tentang protein antimikroba dari cacing tanah di Indonesia. Berdasarkan kajian di atas, maka diharapkan jenis-jenis cacing tanah di Indonesia juga akan mempunyai protein yang berpotensi sebagai antibakteri. Oleh karena, itu sangat menarik untuk dilakukan

penelitian terkait dengan purifikasi dan karakterisasi protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri.

Sebagai alasan digunakan cacing tanah dalam penelitian ini adalah ketersediaannya di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa sangat melimpah dan belum ada yang meneliti.

Pada penelitian ini akan dilakukan purifikasi dan karakterisasi protein antibakteri dari cacing tanah yang memiliki khasiat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif, khususnya *Salmonella typhi* penyebab penyakit tipus. Dalam usaha pemecahan masalah di atas perlu dilakukan: identifikasi cacing tanah, pembuatan dan uji aktivitas ekstrak protein dari cacing tanah. Selanjutnya dilakukan purifikasi dan karakterisasi protein antibakteri meliputi berat molekul, kandungan asam amino, pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas, penentuan konsentrasi hambatan minimum dan sifat kerja protein antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak cacing tanah mengandung protein yang mempunyai daya antibakteri?
2. Berapa diameter zona hambatan pada ekstrak cacing tanah terhadap bakteri uji?
3. Bagaimana hasil purifikasi protein antibakteri dari cacing tanah yang dilakukan menggunakan kromatografi kolom dan gel elektroforesis?

4. Berapa konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri dari cacing tanah terhadap bakteri uji?
5. Bagaimana karakterisasi protein antibakteri dari cacing tanah dalam hal: berat molekul, kandungan asam amino, pengaruh suhu, pH optimum dan sifat kerjanya.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini dilakukan untuk purifikasi dan karakterisasi protein cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Isolasi dan penapisan protein antibakteri dari cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrurus*.
2. Pengujian ekstrak protein dari cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrurus* terhadap bakteri uji.
3. Melakukan purifikasi protein antibakteri dari cacing tanah yang berpotensi menggunakan kromatografi kolom dan gel elektroforesis.
4. Menentukan konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri dari cacing tanah terhadap bakteri uji dengan difusi agar.
5. Melakukan karakteristik protein antibakteri dari cacing tanah yang meliputi: berat molekul dengan SDS-PAGE, kandungan asam amino dengan amino acid analyzer, pengaruh suhu, pH optimum dan sifat kerjanya.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan penelitian lebih lanjut utamanya penggandaan protein antibakteri melalui bioteknologi. Selanjutnya diharapkan dapat dikembangkan sebagai bahan pembuatan obat alternatif penyakit tipus dan penyakit infeksi oleh bakteri lain, sehingga akan membuka wawasan baru dalam upaya pemanfaatan bahan alam secara optimal.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyebaran Cacing Tanah

Ada lebih kurang 1.800 jenis cacing tanah yang tersebar di seluruh dunia (Edwards dan Lofty, 1972). Sebagian besar cacing tanah yang terdapat di Eropa, Asia bagian barat dan Amerika bagian utara termasuk dalam famili Lumbricidae. Di bagian dunia lainnya didapatkan jenis cacing tanah famili berbeda, seperti kebanyakan cacing tanah yang terdapat di Amerika Tengah dan Amerika bagian Selatan termasuk dalam famili *Glossoscolecidae* dan *Megascolecidae*, yang juga banyak terdapat di Asia bagian Timur, Asia bagian Selatan, Asia Tenggara sampai ke Australia. Sekalipun demikian, beberapa jenis *Lumbricidae* terdapat di Asia, New Zealand dan Afrika bagian Selatan.

Cacing tanah yang terdapat di Indonesia tergolong dalam famili *Enchytraeidae*, *Moniligastridae*, *Octochaetidae*, *Glossoscolecidae*, *Megascolecidae*, dan *Lumbricidae*. Genera yang pernah ditemukan ialah *Enchytraeus*, *Frideria*, *Drawida*, *Dichogaster*, *Eudichaster*, *Pontoscolex*, *Pheretima*, *Megascolex* dan *Allolobophora* (Edwards dan Lofty, 1972; Sims dan Easton, 1972). Genus *Pheretima* yang termasuk dalam famili *Megascolecidae* merupakan cacing tanah yang relatif paling banyak ditemukan di Indonesia, berasal dari Asia Tenggara dan menyebar ke daerah tropis lain, subtropis dan bahkan sampai ke daerah temperata (Edwards dan Lofty, 1972; Sims dan Easton, 1972). Di kompleks gunung Gede-Pangrango Jawa Barat, pernah ditemukan beberapa jenis cacing

tanah yaitu *Metaphire caducihaeta* pada ketinggian 2000 m - 2500 m, *P. javanica* dan *P. capensis* pada ketinggian 1600 - 3000 m dan *P. sluiteri* pada ketinggian 1500m-2500m, keempat jenis cacing tanah tersebut termasuk satu famili *Megascolecidae*. Dari famili *Lumbricidae* ditemukan jenis *A. caliginosa* pada ketinggian 2800 - 3000 m (Baguinon,1978).

Cacing tanah merupakan hewan tingkat rendah, karena tidak memiliki tulang belakang dan disebut invertebrata. Cacing tanah dikelompokkan dalam filum *Annelida* yang berarti cincin, karena tubuhnya tersusun atas segmen-segmen atau cincin. Pada setiap segmennya memiliki rambut (seta).

2.2 Fisiologi Cacing tanah

Cacing tanah memiliki 5 pasang lobi. Darah cacing tanah terdiri dari cairan plasma yang mengandung *corpuscles* yang tak berwarna (*amoebocyte*) dan plasma berwarna merah oleh adanya hemoglobin. Pigmen hasil respirasi terlarut di dalamnya. Peredaran darah terjadi keseluruh bagian tubuh dan dari seluruh bagian tubuh dalam suatu sistem pembuluh darah tertutup yang terjadi pada kapiler darah. Zat-zat makanan dan oksigen dialirkan ke sel-sel atau jaringan, sedang CO₂ dikeluarkan.

Kulit bagian epidermis cacing biasanya berfungsi sebagai organ pernafasan. Cacing tanah tidak memiliki sistem pernafasan, memperoleh oksigen dan melepaskan CO₂ melalui membran luar atau kulit. Syarat yang harus dipenuhi untuk pertukaran udara adalah adanya kelembaban yang cukup tinggi pada permukaan kulit. Dalam proses pernafasan oksigen akan bercampur dengan hemoglobin dan diedarkan ke seluruh jaringan. Pada

keadaan mendesak cacing tanah dapat bertahan hidup selama beberapa jam tanpa suplai udara segar.

Sisa-sisa metabolisme dikeluarkan oleh tubuh melalui lubang pelepasan yang disebut *Nephridia*. *Nephridia* berperan seperti tubulus ginjal manusia yang berfungsi dalam proses filtrasi, reabsorpsi dan sekresi sehingga menghasilkan urin bebas protein dan berguna untuk mengatur kesetimbangan cairan tubuh. Hasil ekskresi cacing tanah berupa amonia, urea dan kreatinin yang dibentuk dalam tubuh.

2.3 Sistem Reproduksi Cacing tanah

Cacing tanah termasuk hermaprodit yaitu hewan yang memiliki alat kelamin jantan dan betina dalam satu tubuh. Namun untuk tiap individu tidak dapat melakukan perkawinan sendiri, tetapi untuk pembuahan diperoleh dari perkawinan sepasang cacing tanah, masing-masing akan menghasilkan satu kokon yang berisi telur-telur. Saat mengadakan perkawinan posisi keduanya saling berlawanan, bagian anterior yang satu melekat pada bagian posterior cacing tanah pasangannya. Kedua cacing tanah melakukan perkawinan beberapa jam, dan setelah masing-masing menerima spermatozoa keduanya akan berpisah.

Klitelum akan membentuk selubung kokon yang bergerak ke arah mulut dan bertemu dengan lubang saluran telur, telur-telur itu keluar dari lubang tersebut dan masuk ke dalam selubung kokon yang bergerak ke arah mulut. Pada saat melewati lubang penerima sperma masuklah spermatozoa ke dalam selubung kokon dan terjadi pembuahan. Selubung kokon akan

bergerak ke arah mulut sehingga terlepas dari cacing tanah dan membentuk kokon, setiap satu kokon dapat menetas 1-3 juvenil.

Dalam waktu 16 - 24 hari kokon akan menetas. Cacing tanah mulai dewasa setelah berumur 2,5 - 3 bulan yang ditandai dengan adanya gelang (klitelum) pada tubuh bagian depan.

2.4 Habitat dan Lingkungan Cacing tanah

Cacing tanah mudah beradaptasi dengan lingkungan hidupnya sebab struktur organ yang dimiliki sangat sederhana. Di alam cacing tanah terdapat di daerah tropik sampai subtropik dengan kondisi tanah dan suhu lingkungan yang memenuhi syarat bagi kelangsungan hidupnya. Tanah sebagai media hidup cacing harus memiliki beberapa faktor yang saling terkait satu sama lain untuk mendukung kehidupannya. Distribusi dan populasi cacing tanah sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan antara lain pH tanah, ketersediaan bahan organik, air, suhu, vegetasi, tipe tanah dan ketinggian.

2.4.1 Pengaruh keasaman

Cacing tanah sangat sensitif terhadap tingkat keasaman tanah, sehingga pH tanah merupakan salah satu faktor pembatas dalam penyebarannya dan menentukan jumlah maupun jenis yang dapat hidup pada tanah tertentu. Banyak peneliti menyatakan jenis cacing tanah menyukai pH tanah lebih kurang 7,0 (Moore, 1972; Phillips, 1973). Namun *Lumbricus terrestris* dapat ditemukan di tanah dengan pH 5,2 – 5,4 di Ohio, Amerika Serikat, juga *Allolobophora caliginosa* di dalam tanah dengan pH tanah 5,2 – 5,4 di Denmark. Hanya sedikit cacing tanah yang hidup dengan pH kurang dari 4,3 kecuali satu jenis yaitu *Dendrobaena octaedra* yang

tampaknya merupakan jenis yang tahan asam (Olson, 1968). Di Hutan Lembang Bandung ditemukan jenis cacing tanah *Pheretima javanica* yang hidup pada pH tanah 4,9 (Waluyo, 1993).

2.4.2 Pengaruh kandungan bahan organik

Makanan utama cacing tanah adalah bahan organik, dapat berasal dari sarasah, kotoran ternak atau tanaman dan hewan mati. Cacing tanah menyukai bahan-bahan yang mudah membusuk, karena lebih mudah dicerna oleh tubuhnya.

Kandungan bahan organik di dalam tanah sangat mempengaruhi distribusi cacing tanah. Tanah yang miskin akan bahan organik biasanya tidak dapat menampung jumlah cacing tanah yang banyak. Sebaliknya bila tidak ada cacing tanah, pelapukan bahan organik akan berkurang. Pelapukan bahan organik seperti itu dapat terjadi di hutan maupun padang rumput (Raw, 1962). Di Padang rumput New South Wales, Australia, yang tidak mengandung cacing tanah, tumpukan bahan organik dapat mencapai ketebalan 4 cm sebelum cacing tanah diintroduksi sebagai percobaan.

2.4.3 Pengaruh air

Kadar air dalam tanah sangat mempengaruhi aktivitas kehidupan cacing tanah. Cacing tanah akan hidup lebih dalam dari permukaan tanah apabila permukaan tanah mengalami kekeringan. Kadar air yang optimal untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan cacing tanah adalah 15 – 30%. Sebanyak 75% - 90% dari bobot cacing tanah yang hidup tersusun dari air (Grant, 1985). Dengan demikian, kehilangan air dari tubuh merupakan

persoalan utama bagi kehidupannya. Beberapa jenis cacing tanah mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup dengan gerakan yang lebih sesuai atau dengan diam. Bila tidak dapat menghindar dari tanah yang kering, cacing tanah dapat hidup dengan kehilangan sebagian besar air dari tubuhnya. *Lumbricus terrestris* dapat kehilangan 70% air dan *Allolobophora chlorotica* 75% air dari seluruh air tubuhnya, namun masih tetap dapat hidup (Roots, 1986). Grant (1985) mengatakan bahwa sebagian besar *Lumbricidae* dapat kehilangan air tubuhnya sampai lebih dari 50%.

Faktor kelembaban tanah juga mempengaruhi distribusi cacing tanah. Sebagian besar jenis cacing tanah pada kondisi normal hidup dekat permukaan tanah. Bila permukaan tanah menjadi kering, maka cacing tanah bermigrasi ke lapisan tanah yang lebih dalam atau ke tempat lain yang kondisi tanahnya lebih sesuai. Begitu juga halnya dengan peletakan kokon, bila kondisi tanah sangat lembab, kokon diletakkan lebih dekat ke permukaan tanah, tetapi bila kondisi tanah kering, maka peletakan kokon akan lebih dalam lagi (Edwars dan Lofty, 1972). Dash dan Senapati (1982) juga mengemukakan bahwa pada beberapa tanah tropis di India, kelembaban tanah menunjukkan korelasi yang positif dengan produksi kokon cacing tanah *Lampito mauritii*, *Octochaetona surensis* dan *Drawida calebi*.

2.4.4 Pengaruh suhu

Aktivitas, pertumbuhan, metabolisme, respirasi dan reproduksi cacing tanah sangat dipengaruhi oleh suhu. Jumlah kokon yang dihasilkan oleh *Pheretima javanica* dan beberapa jenis lain dari *Lumbricidae* berlipat empat di atas kisaran suhu 9°C – 16°C (Evan dan Guild, 1968). Kokon juga

menetas lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi, kokon dari *A. chlorotica* menetas dalam waktu 36 hari pada 20⁰C, 49 hari pada suhu 15⁰C dan 112 hari pada suhu 10⁰C bila air cukup tersedia (Gerard, 1980).

Selama musim dingin, hanya beberapa kokon yang menetas, dan menguntungkan untuk kelangsungan hidup, karena cacing yang baru menetas tampaknya mengalami kesulitan untuk bertahan hidup dalam keadaan yang sangat dingin.

Periode pertumbuhan mulai dari penetasan sampai dewasa secara seksual juga tergantung pada suhu. Sebagai contoh, *Allolobophora chlorotica* memerlukan 29-42 minggu untuk menjadi dewasa di dalam ruangan yang tidak dipanaskan, 17-19 minggu pada suhu 15⁰C dan 13 minggu pada suhu 18⁰C (Michon, 1979).

Grant (1985) mengemukakan bahwa suhu yang paling disukai oleh *Pheretima hupeiensis* adalah 15⁰C sampai 23⁰C, untuk *Allolobophora caliginosa* antara 10⁰C sampai 23,2⁰C. Menurut Reinecke (1974). *Eisenia rosea* tampaknya lebih menyukai suhu antara 24,1⁰C sampai 25,6⁰C. Pada permukaan tanah suhu dapat lebih tinggi dari suhu tersebut di atas, cacing tanah dapat tetap hidup, karena dapat memelihara suhu tubuh lebih rendah di lingkungan tertentu dengan menguapkan air dari permukaan tubuhnya (Hogben dan Kirk, 1974).

2.4.5 Pengaruh vegetasi

Vegetasi mempengaruhi distribusi dan kepadatan populasi cacing tanah. Di Kosciuscko rumput penutup dan sarasah *Eucalyptus* di hutan dan penutup *Celmisia* di herba alpin tampaknya mempunyai sedikit atau tanpa pengaruh atas populasi cacing tanah, tetapi di tanah hutan jumlah cacing

tanah lebih banyak di bawah pohon-pohon. Hal ini dapat dikaitkan dengan kenyataan bahwa pohon-pohon menaikkan kelembaban dan menambah nutrisi yang menimbulkan pertumbuhan rumput lebih cepat di bawah pohon (Wood, 1974).

2.4.6 Pengaruh tipe tanah

Tipe tanah juga menentukan keanekaragaman jenis dan kepadatan populasi cacing tanah. Pada tanah liat, kepadatan populasi cacing tanah relatif lebih rendah dibanding pada tanah yang kurang liatnya. Pada tanah gambut yang asam kepadatan cacing tanahnya rendah sekali, sebaliknya di tanah yang gembur keanekaragaman dan kepadatannya tinggi (Satchell, 1987; Lofty, 1972).

Beberapa cacing tanah dapat hidup di padang pasir dan di semi padang pasir dan beberapa cacing tanah yang lain dapat hidup di daerah kering, dingin di Rusia Timur Laut (Kubiens, 1983). Walaupun cacing tanah hidup lebih baik pada tanah yang subur dari pada tanah yang kurang subur, mereka dapat hidup pada berbagai jenis tanah, bila tersedia cukup makanan dan air.

2.4.7 Pengaruh ketinggian

Lee (1989) melaporkan bahwa kepadatan *Megascolecidae* di gunung di kepulauan utara Selandia Baru berkurang dengan bertambahnya ketinggian. Sergienko (1969) menemukan berkurangnya biomassa *Lumbricidae* di daerah Chernogora, Rusia dari 16,5 g/m pada ketinggian 1000 m sampai 2,2 g/m pada ketinggian 1800 m. Telah ditemukan lima jenis *Lumbricidae* pada ketinggian 740 m, empat jenis pada ketinggian 1000

m, tiga jenis pada ketinggian 1300 m dan satu jenis pada ketinggian 1600 m – 1800 m. Di Perancis Bouche (1972) menemukan 15 jenis *Lumbricidae* pada ketinggian 1500 m, tujuh jenis pada ketinggian 2000 m dan empat jenis pada ketinggian 2500 m.

2.5 Kandungan Zat dalam Cacing Tanah

Dari berbagai hasil penelitian diperoleh bahwa cacing tanah mengandung protein yang sangat tinggi, yaitu 65 – 84,5%. Protein cacing tanah terdiri dari asam-asam amino esensial yang lengkap dan kadarnya cukup tinggi. Simanjuntak dan Waluyo (1982) melaporkan komposisi asam amino dalam cacing tanah adalah: arginin, sistin, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenionin, fenilalanin, serin, treonin, tirosin dan valin. Menurut Albro dkk (1992) bahwa lipid dalam cacing tanah *Lumbricus terrestris* hanya 3% dari total berat kering, lipid tersebut terdiri dari fosfolipid, fosfatidilcolin, fosfatidilethanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol dan sphingomyelin. Kandungan protein cacing tanah sangat tinggi yaitu 61,0% - 78,0% dari total berat kering (lebih tinggi dari pada ikan 60,9% dan daging 51,0%) yang dihitung dari jumlah total nitrogen yang terkandung di dalamnya (Waluyo, 1995).

Cacing tanah juga mengandung senyawa *all-cis-5,8,11,14-icosapentanoic acid (arachidonic acid)* dan *all-cis-5,8,11,14-icosapentanic acid* yang diduga dapat menurunkan demam akibat infeksi (Muliasari, 1996).

Pada umumnya hampir semua sel dan organ-organ hewan mempunyai aktivitas enzim katalase, terutama ditemukan pada organ jantung, eritrosit dan ginjal. Enzim ini berperan dalam menguraikan hidrogen

peroksida menjadi air dan oksigen. *Lumbricus rubellus* mengandung enzim *lumbrokinase* yang sangat efektif untuk membantu penyembuhan penyakit tekanan darah, baik hipertensi ataupun hypotensi. Selain itu juga mengandung enzim peroksidase dan katalase yang bermanfaat untuk membantu proses penyembuhan penyakit degeneratif (Sugiarto, 1998).

2.6 Manfaat Cacing Tanah

Budidaya cacing tanah di Indonesia masih merupakan hal yang baru, penggunaannya juga masih terbatas hanya untuk pakan ternak atau ikan. Tidak seperti negara-negara lain yang selain memanfaatkannya sebagai pakan ternak, juga digunakan sebagai bahan obat, bahan kosmetik, pertanian, pengurai sampah bahkan sebagai makanan.

Potensi cacing tanah telah digunakan secara luas sejak tahun 1340 sebelum Masehi. Menurut pengobatan tradisional Cina, cacing tanah memiliki pengaruh antipiretik, antispasmodik dan diuretik. Baru-baru ini telah ditemukan bahwa cacing tanah telah memiliki efek antiasmatik, antihipertensi dan antialergi (Muliasari, 1996).

Ju Hyun dkk. (1998) mengemukakan bahwa antimikroba peptida terbaru telah diisolasi dan dikarakterisasi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* yang disebut *lumbricin I*, yaitu sebuah antimikroba peptida yang mengandung banyak prolin yaitu sebesar 15%, terdiri dari 62 asam amino dan mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Selain itu, Milochau dkk. (1997) telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi protein antibakteri dari cairan *coelomic* cacing tanah *Eisenia fetida andrei* mempunyai aktivitas

antibakteri dan diberi nama *fetidin* dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0 kDa.

Cacing tanah yang sudah dikeringkan dapat digunakan untuk menyembuhkan luka, abses, radang tenggorokan serta mengurangi sakit telinga. Secara internal cacing tanah dapat digunakan dalam penyembuhan batuk kronis, difteri dan sakit kuning serta dapat membantu kelahiran. Cacing tanah juga bermanfaat untuk reumatik, penyakit syaraf, bronchitis dan tuberculosis (Mulasari, 1996).

Di Jepang *Vermijuce* dipakai sebagai obat penyembuh sakit kepala dan di dalam ekstrak cacing tanah terdapat antipiretik dan vitamin sebagai penyembuh varises (Affandi, 1996).

Handreck dan Arthur (1988) melaporkan bahwa cacing tanah antara lain berperan : dalam memecah materi organik, mencampur materi organik ke dalam tanah, menghancurkan lapisan serasah daun yang tebal, menaikkan aktivitas mikroba tanah, menaikkan nutrisi dalam tanah dan bahan organik untuk tumbuhan, meremah-remah dan memperbaiki struktur tanah, menaikkan kandungan air yang dapat tersimpan dalam tanah, menyebabkan penetrasi oksigen dan air yang lebih baik di dalam tanah yang berguna bagi akar-akar tumbuhan, menaikkan hasil panen tanaman, membantu pengembalian kesuburan tanah, dapat digunakan untuk makanan itik, ayam dan ikan, dapat juga dimakan manusia karena mengandung protein tinggi.

Secara empirik Sugiarto (1998) membuat ramuan obat dari cacing tanah untuk mengatasi masalah kesehatan sendiri, agar pencegahan atau pertolongan pertama pada gangguan kesehatan dapat dilakukan sedini

mungkin sebelum mendapat perawatan medis sebagaimana mestinya. Hasil yang dirasakan sangat positif terhadap daya tahan tubuh dan penyembuhan beberapa macam gangguan penyakit pencernaan dan pernafasan. Sejak itu, mulai diketahui dan dicoba oleh masyarakat sekitar tempat tinggal yang hasilnya dilaporkan sangat membantu penyembuhan kesehatan bagi yang mengkonsumsi. Sejak itu pula perkembangan berlanjut kepada konsumen yang lebih luas, terutama bagi mereka yang memperoleh informasi dari orang yang pernah mengkonsumsi.

Berdasarkan kerja sama penelitian yang dilakukan dengan mahasiswa Biologi Unpad terbukti bahwa ekstrak dari cacing tanah ini dapat menghambat pertumbuhan 5 jenis bakteri, yaitu: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Listeria monocytogenes*. Hal ini berarti bahwa bahan cacing tanah ini dapat digunakan sebagai obat penyembuh penyakit yang disebabkan oleh bakteri tersebut. Selain itu, cacing tanah mengandung asam arakidonat yang sangat efektif sebagai penurun suhu tubuh pada demam infeksi. Berdasarkan penelitian Karsten dan Drake (2002), ekstrak cacing tanah terdapat sejumlah enzim seperti *lumbrokinase*, *peroksidase*, dan selulase. Komponen lain adalah antipiretik (penurun panas) yaitu asam arakhidonat, antipurin, antiracun dan vitamin. Kandungan zat-zat itulah yang menyebabkan cacing tanah mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan menurunkan suhu tubuh.

Obat dari bahan cacing tanah ini telah beredar di berbagai kota. Di pedesaan cacing tanah dapat digunakan sebagai obat tipus dengan berbagai

cara, ada yang direbus, digoreng tanpa minyak dan ada pula yang digerus dicampur air labu siyem kemudian diminum.

Pemanfaatan cacing tanah untuk antipiretik lebih aman, karena komponen kimia cacing tanah tidak menimbulkan efek toksik bagi manusia dan aman dikonsumsi. Satu-satunya efek toksik cacing tanah adalah dapat mengakumulasi logam berat (yang ada di dalam tanah) dalam tubuhnya. Cacing tanah dapat menoleransi logam berat dalam konsentrasi yang cukup tinggi. Namun hal ini dapat diatasi dengan vermikultur, yaitu membuat media tumbuh yang baik bagi cacing tanah. sehingga cacing bebas dari pencemaran logam berat.

2.7 Tinjauan Tentang Protein Antibakteri

Protein antimikroba dikenali sebagai senyawa terbesar terhadap perlindungan diri baik pada vertebrata maupun invertebrata. Nilai lebih protein antimikroba terletak pada kemudahan dan kecepatan diproduksi, spesifikasi yang luas terhadap sel-sel prokariotik, dan kurangnya efek beracun bagi organisme eukariotik (Boman, 1993). Protein bertindak sebagai pertahanan pertama terhadap serangan mikroorganisme, melengkapi sistem humoral dan kekebalan sel inang. Banyak jenis protein antimikroba yang beraktivitas sebagai antimikroba terhadap bakteri, fungi, dan virus, telah diisolasi dari beranekaragam sumber (Nicolas, 1995).

Sebagian besar protein antimikroba ini mempunyai nilai lebih dibandingkan yang lain, meskipun beberapa protein antimikroba non-kationik baru-baru ini telah berhasil ditemukan, berbagai kesamaan sebagai kationik, tetapi di lain pihak berbeda jauh sifat-sifat dasarnya, seperti ukurannya,

keberadaan ikatan-ikatan disulfida dan motif strukturalnya (Hancock dkk. 1998). Protein ini menunjukkan daya antimikroba baik melalui lapisan membran lipid *bilayer* sel dengan membentuk lubang-lubang, atau berinteraksi dengan DNA atau RNA setelah penetrasi ke dalam membran sel (Hancock, 1998). Sifat protein antimikroba yang paling menakjubkan adalah bahwa jarang sekali memicu resistansi bakteri, yang pada umumnya akan memicu masalah serius jika berhubungan dengan antibiotik-antibiotik konvensional. Oleh karena itu, protein antimikroba muncul sebagai salah satu kandidat yang paling menjanjikan bagi suatu kelas antibiotik baru (Kelly, 1996).

Saat ini mayoritas protein antimikroba telah diisolasi dari amphibi, serangga, mamalia, dan crustacea. Beberapa protein antimikroba juga ditemukan pada Nematoda, cacing tanah dan ikan (Cociancich dkk. 1994). Laporan keberadaannya pada jenis hewan yang lain sangatlah jarang, meskipun molekul-molekul semacam itu diperkirakan tersebar luas di seluruh hewan. Secara khusus, protein antimikroba terdapat pada hampir semua invertebrata karena hewan ini tidak memproduksi antibodi yang spesifik sehingga harus bergantung pada mekanisme pembawaan untuk melindungi diri dari serangan mikroba.

2.8 Antibiotik

Antibiotik adalah senyawa kimia khas yang dihasilkan oleh organisme hidup, termasuk struktur analognya yang dibuat secara sintetik, yang dalam kadar rendah mampu menghambat proses penting dalam kehidupan mikroorganisme. Pada awalnya antibiotik diisolasi dari mikroorganisme,

tetapi sekarang beberapa antibiotik telah didapatkan dari tanaman tinggi atau binatang.

2.8.1 Sumber antibiotik

Antibiotik berasal dari berbagai sumber antara lain yaitu *Actinomycetales* (58,2%), jamur (18,1%), tanaman tinggi (12,1%), *Eubacteriales* terutama *bacilli* (7,7%), binatang (1,8%), *Pseudomonadales* (1,2%) dan ganggang atau lumut (0,9%) (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

2.8.2 Manfaat antibiotik

Mikroorganisme dapat menyebabkan banyak bahaya dan kerusakan. Hal ini nampak dari kemampuannya menginfeksi manusia, hewan, serta tanaman, menimbulkan penyakit yang berkisar dari infeksi ringan sampai kepada kematian. Karena itu adanya prosedur untuk mengendalikan pertumbuhan dan kontaminasi oleh mikroba merupakan suatu keharusan. Pengendalian yang dimaksud adalah segala kegiatan yang dapat menghambat dan membasmi mikroorganisme.

Pentingnya pengendalian mikroorganisme yang merugikan bagi manusia dapat dilakukan dengan mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inangnya yang terinfeksi, mencegah pembusukan dan perusakan bahan oleh mikroorganisme. Oleh karena itu antibiotik sangat besar manfaatnya bagi manusia.

2.8.3 Mekanisme kerja antibiotik

Suatu zat antibiotik yang ideal memiliki toksisitas selektif. Istilah ini secara tidak langsung menyatakan bahwa suatu obat berbahaya terhadap parasit, tetapi tidak membahayakan inang. Sering kali, toksisitas selektif lebih

bersifat relatif dari pada absolut; ini berarti bahwa suatu obat dalam konsentrasi tertentu dapat ditahan oleh inang, tetapi dapat merusak parasit.

Toksisitas selektif dapat berupa fungsi dari suatu perantara khusus yang dibutuhkan untuk perlekatan obat, atau dapat tergantung pada penghambatan proses biokimia yang penting untuk parasit tetapi tidak untuk inang. Mekanisme kerja sebagian besar antibiotik belum dimengerti secara jelas. Namun untuk mudahnya mekanisme kerja antibiotik dibagi menjadi 4 cara: (1) hambatan sintesis dinding sel; (2) perubahan permeabilitas selaput sel atau hambatan pengangkutan aktif melalui selaput sel; (3) hambatan sintesis protein; (4) hambatan sintesis asam nukleat (Jawetz dkk., 1995).

1) Hambatan sintesis dinding sel

Berbeda dengan binatang, mikroorganisme memiliki suatu lapisan luar yang kaku disebut dinding sel. Dinding ini mempertahankan bentuk mikroorganisme dan menahan sel kuman, yang memiliki tekanan osmotik tinggi. Tekanan osmotik pada bakteri Gram positif 3-5 kali lebih besar dibanding bakteri Gram negatif. Kerusakan pada dinding sel misalnya oleh lisozim atau hambatan pembentukannya dapat berakibat lisis pada sel. Dalam lingkungan yang hipertonik misalnya sukrosa 20%, gangguan (kerusakan) pembentukan dinding sel mengakibatkan terbentuknya "protoplas" kuman yang bulat dari bakteri Gram positif atau "sferoplas" dari Gram negatif; bentuk ini dibatasi hanya oleh selaput sitoplasma yang rapuh. Bila protoplas atau sferoplas ditempatkan dalam lingkungan dengan tonositas biasa, maka protoplas atau sferoplas dapat pecah.

Dinding sel mengandung zat yang secara kimiawi merupakan suatu polimer kompleks "mukopeptida" (murein, peptidoglikan), terdiri dari polisakarida dan suatu polipeptida dengan banyak hubungan silang. Polisakaridanya biasanya mengandung gula amino N-asetilglukosamin dan asam asetilmuranat, yang terakhir hanya terdapat pada kuman. Pada gula amino terikat rantai-rantai pentapeptida. Kekakuan dinding sel akhirnya ditambah lagi dengan hubungan silang dari rantai-rantai peptida yaitu melalui ikatan pentagsilin sebagai reaksi-reaksi transpeptidase yang dikerjakan beberapa enzim. Lapisan peptidoglikan lebih tebal pada dinding sel kuman Gram positif dari pada dinding sel kuman Gram negatif (Jawetz dkk., 1995).

2) Perubahan permeabilitas selaput sel atau hambatan pengangkutan aktif melalui selaput sel

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput sitoplasma, yang bekerja sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif, melakukan pengangkutan aktif, dan dengan demikian mengendalikan susunan dalam dari sel. Bila integritas fungsi selaput sitoplasma terganggu, nukleotida purin dan pirimidin dan protein akan lolos dari sel, dan timbullah kerusakan atau kematian sel. Selaput sitoplasma kuman dan jamur memiliki struktur yang berlainan dan dapat lebih mudah terganggu oleh zat-zat tertentu daripada selaput sel binatang. Akibatnya daya kerja khemoterapeptida selektif dapat terlaksana.

Contoh paling menonjol dari mekanisme ini ialah polimiksin yang bekerja pada kuman Gram negatif dan antibiotik polien bekerja terhadap jamur. Namun polimiksin tidak aktif terhadap jamur, dan polien tidak aktif terhadap kuman. Ini disebabkan karena sterol terdapat pada selaput sel

jamur dan tidak ada pada selaput sel kuman. Polien harus berinteraksi dengan suatu sterol dalam suatu selaput sel jamur sebelum dapat memperlihatkan efeknya terhadap jamur itu. Selaput sel kuman tidak mengandung sterol tersebut dan menjadi resisten terhadap daya kerja polien, merupakan contoh yang baik dari individual sel dan toksisitas selektif. Polimiksin tidak akan bekerja terhadap selaput sel jamur yang mengandung sterol. Imidazol antijamur mengganggu integritas selaput sel jamur dengan menghambat biosintesis lemak-lemak selaput (Jawetz dkk.,1995).

3) Hambatan sintesis protein

Telah dipastikan bahwa kloramfenikol, tetrasiklin, aminoglikosida, eritromisin dan linkomisin dapat menghambat sintesis protein pada bakteri. Puromisin merupakan suatu penghambat sintesis protein yang efektif dalam sel binatang dan sel-sel lain. Pengertian sintesis protein telah mengalami perubahan yang cepat, dan mekanisme kerja yang tepat obat-obatan ini belum dapat ditentukan secara lengkap.

Bakteri memiliki ribosom 70S, sedangkan sel-sel binatang menyusui memiliki ribosom 80S. Subsatan tiap jenis ribosom, susunan kimiawinya, dan kekhususan fungsinya sudah cukup berbeda untuk dapat menerangkan mengapa obat antibakteri dapat menghambat sintesis protein dalam ribosom sel binatang menyusui (Jawetz dkk.,1995).

4) Hambatan sintesis asam nukleat

Obat-obat seperti aktinomisin merupakan penghambat efektif terhadap sintesis DNA. Sebenarnya, obat-obat demikian membentuk kompleks dengan DNA melalui ikatan pada residu deoksiganosin.

Kompleks DNA-aktinomisin menghambat polimerase RNA yang tergantung pada DNA serta menahan pembentukan mRNA. Aktinomisin menghambat pula replikasi DNA. Mitomisin menghasilkan hubungan silang yang kuat dari untaian komplementer DNA dan sebagai akibatnya menahan replikasi DNA. Aktinomisin menghambat sel-sel bakteri maupun sel-sel binatang dan tidak cukup selektif untuk digunakan dalam khemoterapi antibakteri.

Rifampin menghambat pertumbuhan bakteri kuman melalui ikatan kuat pada RNA polimerase kuman yang tergantung pada DNA. Jadi dapat menghambat sintesis RNA bakteri. Mekanisme kerja rifampin terhadap virus adalah lain. Rifampin menahan suatu tahap lanjut dalam perakitan virus pox.

Banyak mikroorganisme mengandung asam p-aminobenzoat (PABA) yang merupakan metabolit utama. Asam ini digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan asam folat, yang merupakan suatu langkah penting dalam sintesis asam nukleat. Daya kerja khusus PABA meliputi suatu kondensasi yang tergantung adenosin trifosfat (ATP) dari suatu pteridin dengan PABA untuk menghasilkan asam dihidropteroat, yang kemudian diubah menjadi asam fosfat. Sulfonamida merupakan analog struktural dari PABA dan menghambat sintetase dihidropteroat.

Sulfonamida dapat memasuki reaksi sebagai pengganti PABA dan bersaing untuk aktif dari enzim. Akibatnya terbentuklah analog asam folat yang tidak berfungsi mencegah pertumbuhan sel kuman lebih lanjut. Daya hambat sulfonamida terhadap pertumbuhan kuman dapat dilawan oleh PABA yang berlebihan di lingkungan (hambatan karena persaingan). Sel-sel binatang tidak dapat membentuk asam folat dan harus tergantung pada sumber-sumber luar. Beberapa kuman, seperti sel-sel binatang, tidak

dihambat oleh sulfonamida, namun banyak kuman lain membentuk asam folat seperti yang disebut di atas dan akibatnya peka terhadap sulfonamida.

Bakteri tuberkolosis tidak nyata terhambat pertumbuhannya oleh sulfanamida, tetapi pertumbuhannya dihambat oleh PAS (asam p-aminosalisilat). Sebaliknya sebagian besar kuman yang peka sulfonamida resisten terhadap PAS. Ini membuktikan kesan bahwa tempat penerima PABA berbeda untuk jenis-jenis kuman yang berlainan (Jawetz dkk., 1995).

Doerge (1982) melaporkan bahwa mekanisme kerja antibiotik dapat dibedakan menurut tempat kerjanya, seperti dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Penggolongan antibiotik berdasarkan tempat kerjanya

Tempat kerja	Proses yang dihambat	Antibiotik	Tipe aktivitas
Dinding sel	Biosintesis peptidoglikan	- Penisilin - Sefalosporin - Basitrasin - Vankomisin - Sikloserin	Bakterisida Bakterisida Bakterisida Bakterisida Bakterisida
Membran sel	Fungsi dan integritas Membran sel	- Nistatin - Amfoterisin - Polimiksin B	Fungisida Fungisida Bakterisida
Asam nukleat	- Biosintesis DNA - Biosintesis mRNA - Biosintesis DNA dan MRNA	- Mitomisin C - Rifampisin - Griseofulvin	Fangisida Bakterisida Fungisida
Ribosom			
- Sub unit 30 S prokariotik	- Biosintesis protein	- Aminosiklitol - Tetrasiklin	Bakterisida Bakteriostatik
- Sub unit 50 S prokariotik	- Biosintesis protein	- Amfenikol - Makrolida	Bakteriostatik Bakteriostatik
- Sub unit 60 S eukariotik	- Biosintesis protein	- Linkosamida - Glutarimid - Asam fusidat	Bakteriostatik Fungisida Bakterisida

2.8.4 Spektrum antibiotik

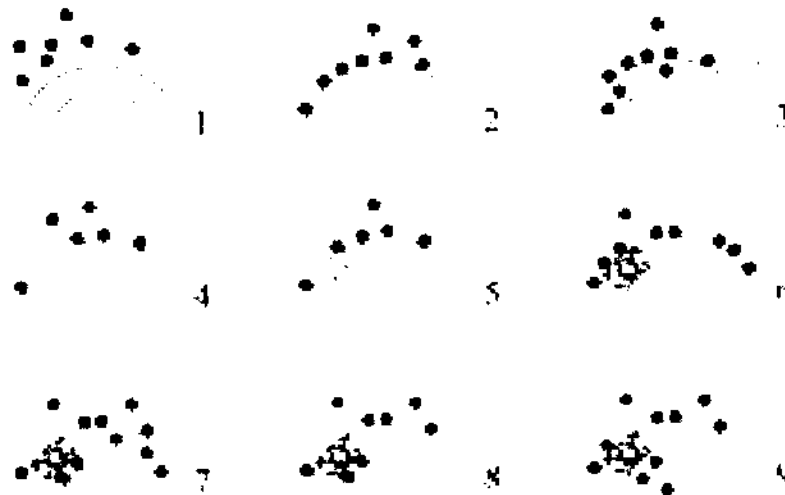
Penggolongan antibiotik berdasarkan spektrum aktivitasnya ada 6 macam (Jawetz dkk., 1995).

1. Antibiotik dengan spektrum luas, efektif baik terhadap Gram positif maupun Gram negatif. Contoh : turunan tetrasiklin, turunan amfenikol, turunan aminoglikosida, turunan makrolida, rifampisin, hetasilin, pivampisilin, sulbenisilin dan tikarsilin dan sebagian besar turunan sefalosporin.
2. Antibiotik yang aktivitasnya lebih dominan terhadap bakteri Gram positif, contoh : basitrasin, eritromisin, sebagian besar turunan penisilin, seperti benzilpenisilin, penisilin G prokain, penisilin V, fenetisilin K, metisilin Na, nafsilin Na, oksasilin Na, Kloksasilin Na, dikloksasilin Na, dikloksasilin Na dan flifoksasilin Na, turunan linkosamida, asam fusidat dan beberapa turunan sefalosporin.
3. Antibiotik yang aktivitasnya lebih dominan terhadap bakteri Gram negatif, contoh: kolistin, polimiksin B sulfat dan sulfomisin.
4. Antibiotik yang aktivitasnya lebih dominan terhadap Mycobacteriae (antituberkulosis), contoh: streptomisin, kanamisin, sikloserin, rifampisin, viomisin dan kapreomisin.
5. Antibiotik yang aktif terhadap jamur (antijamur), contoh : griseofulvin dan antibiotik polien, seperti nistatin, amfoterisin B dan kandisidin.
6. Antibiotik yang aktif terhadap neoplasma (anti kanker), contoh: akinomisin, bleomisin, daunorubisin, doksorubisin, mitomisin dan mitramisin.

2.9 Mekanisme kerja protein Antibakteri

Peptida antibakteri berkekuatan ganda dan pengaruh itu secara serentak, pada umumnya cepat dan aktivitasnya pada mikroba sangat kuat. Kerja peptida sering bersifat bakterisidal, akibatnya hal itu tidak dapat diubah dan besar sekali adanya gangguan di dalam struktur sellular atau fungsi inti sel. Konsep mekanisme kerja peptida antibakteri bekerja secara paralel meskipun ada perbedaan yang besar di antara sumber, komposisi dan konformasi. Secara umum tampak akan berintegrasi dengan tahap-tahap sebagai berikut :

1). Pengaruh timbal balik pada awalnya dengan target sel-sel yang seharusnya hidup untuk electrostatic, hydrophobic atau afinitas yang lain di dalam hubungan biokimia dan biofisika. 2). Transisi tahap-tahap penyesuaian di dalam kerangka kerja dari target membran (transisi pada penyesuaian tenaga gerak helix). 3). Penimbunan pada peralatan stoichiometri pemula yang mengaktifkan peptida monomer atau gangguan membran non spesifik multimer atau penggabungan diri dan pori-pori berikutnya atau susunan saluran. 4). Gangguan membran pada waktu yang singkat atau dalam waktu yang lebih lama menghasilkan penembusan depolarisasi dan hubungan yang mungkin menyebabkan gangguan secara langsung ataupun tidak langsung pada penyeberangan antar wilayah; 5). Peptida di dalam membran yang mengakses dan mencegah target intra sel. (lihat Gambar 1.).



Gambar 2.1 Model mekanisme kerja peptida antibakteri dengan cara menghambat atau membunuh bakteri patogen (Michael dan Nannette, 2003).

Keterangan :

- 1). Daya tarik ikatan hidrogen dan elektrostatis.
- 2). Akibat pengaruh timbal-balik sebagai peptida yang menghubungkan pada target permukaan.
- 3). Penggerak utama pada permulaan dan penimbunan yang merupakan penyesuaian peptida sel awal dan perubahan membran pada awalnya.
- 4). Peralihan pada tahap penyesuaian peptida dan penyisipan ke dalam inti membran.
- 5). Penggabungan diri dan pengadaan.
- 6). Formasi dan kelengkapan peptida yang berdekatan, seperti konfigurasi pori-pori.
- 7). Peptida antar wilayah pada permukaan dalam membran sitoplasma.
- 8). Penimbunan-penimbunan pada peptida yang selalu terus berjalan seperti yang digambarkan di atas.
- 9). Akses dan target fungsi serta pokok intra sel peptida antibakteri Gram negatif diidentifikasi sebagai benda yang gelap dimana peptida menstransformasikan sesuatu yang diaktifkan.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Cacing tanah berkhasiat untuk pengobatan berbagai penyakit antara lain: infeksi saluran pencernaan, hipertensi, menurunkan kadar kolesterol, diabetes, infeksi saluran pernafasan, rematik, penyakit maag, eksim dan alergi. Cacing tersebut juga digunakan untuk merawat kelembutan kulit, meningkatkan daya tahan tubuh (Sugiarto, 1998). Di pedesaan cacing tanah telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit tipus.

Secara umum cacing tanah mengandung protein, asam amino dan bermacam-macam enzim. Beberapa penelitian juga telah membuktikan adanya daya antibakteri cacing tanah jenis *Lumbricus rubellus* yang dapat membunuh bakteri Gram negatif *Escherisia coli*, *Shigella*, *Salmonella typhi* dan Gram positif *Staphylococcus aureus* (Affandi, 1996; Muliastari, 1996).

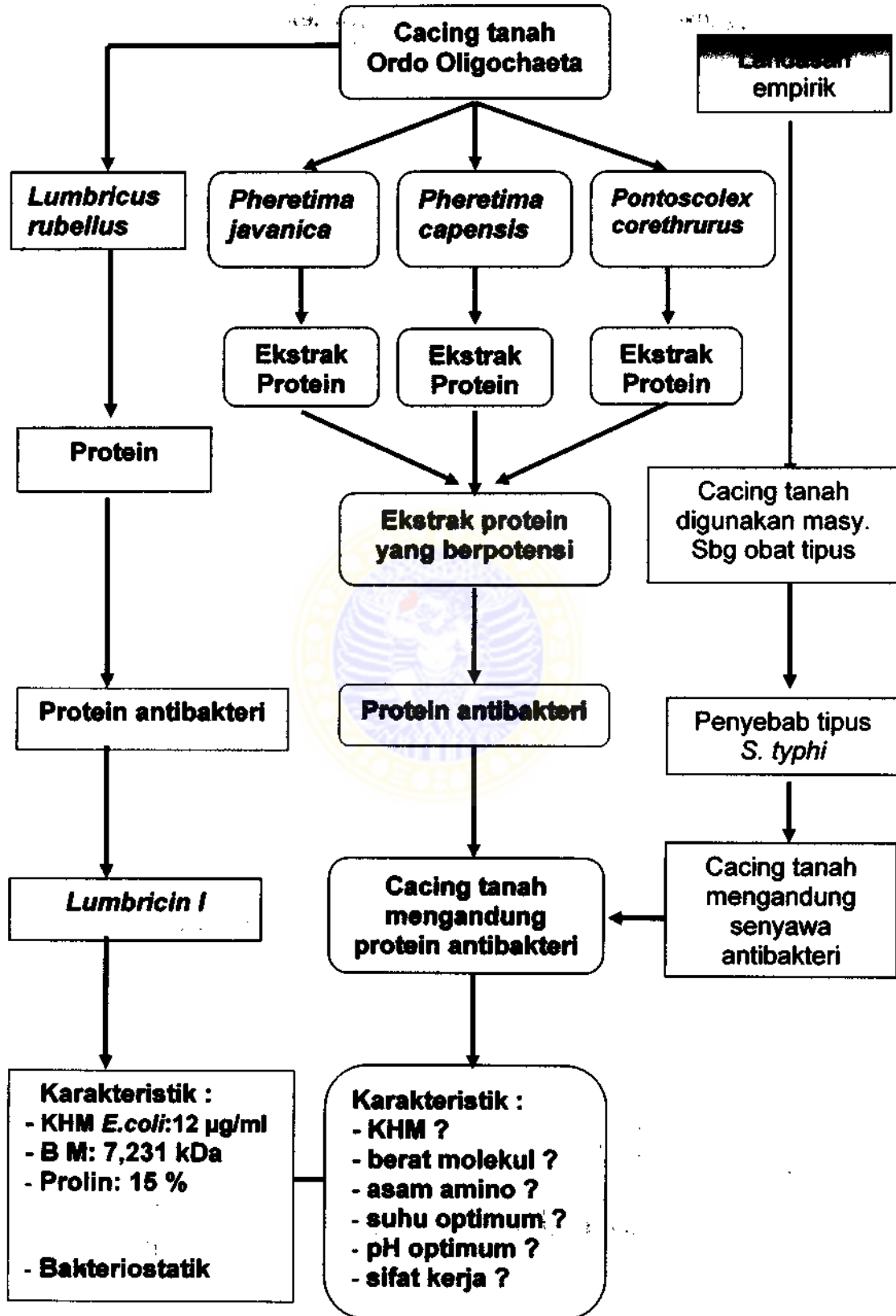
Ju Hyun dkk. (1998) telah melakukan isolasi dan karakterisasi peptida antimikroba terbaru dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* yang disebut *lumbricin I*. Peptida antimikroba tersebut mengandung banyak prolin sebesar 15% dan terdiri dari 62 asam amino, serta mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Selain itu, Milochau dkk. (1997) juga telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi protein antibakteri dari cairan *coelomic* cacing tanah *Eisenia fetida andrei* yang mempunyai aktivitas antibakteri dan diberi nama "fetidin" dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0 kDa.

Jenis cacing tanah yang banyak ditemukan di masyarakat adalah cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis*, *Pontoscolex coretrurus*. Cacing tanah *Pheretima javanica* mempunyai tubuh yang lebih

besar dan panjang serta populasi paling banyak di antara cacing tanah yang lain (Waluyo, 1993). Semua jenis cacing tanah diatas termasuk dalam satu ordo,

Saat ini mayoritas protein antimikroba telah diisolasi dari amphibi, serangga, mamalia, dan crustacea. Beberapa protein antimikroba juga ditemukan pada Nematoda, cacing tanah dan ikan (Cociancich dkk. 1994). Laporan mengenai keberadaannya pada jenis hewan yang lain sangatlah jarang, meskipun molekul-molekul semacam itu diperkirakan tersebar luas di seluruh hewan. Secara khusus, protein antimikroba terdapat pada hampir semua invertebrata, karena hewan ini tidak memproduksi antibodi yang spesifik, sehingga harus bergantung pada mekanisme pembawaan untuk melindungi diri dari serangan mikroba.

Beberapa jenis cacing tanah yang sudah diteliti yaitu *Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida andrei*, *Pheretima acatina*, *Pheretima sp.* dan *Pheretima allolobophora* semua termasuk dalam satu Ordo *Oligochaeta* dan semua mengandung protein antibakteri. Dilihat dari hubungan kekerabatan jenis cacing tanah yang akan diteliti yaitu : *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis*, *Pontoscolex coretrurus*, semua juga dalam satu ordo *Oligochaeta*, yang mempunyai tempat hidup dalam habitat yang sama, yaitu hidup di dalam tanah, makanannya bahan organik yang banyak mikroorganisme. Maka dalam penelitian nanti diharapkan cacing tanah yang akan diteliti juga mengandung protein antibakteri.



Gambar 3.1 Diagram Kerangka Konseptual

3.2 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah: cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex coretrurus* mengandung protein antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk purifikasi dan karakterisasi protein antibakteri cacing tanah yaitu *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis*, *Pontoscolex corethrurus*. Dipilih tiga jenis cacing tanah tersebut dengan pertimbangan populasinya besar. Pengambilan sampel cacing tanah dilakukan secara acak di daerah Kota Kabupaten Jember. Penelitian dilakukan dengan tahapan: 1. Identifikasi cacing tanah; 2. Pembuatan ekstrak protein dari tiga jenis cacing tanah dalam tiga macam pelarut; 3. Uji aktivitas ekstrak cacing tanah; (4) Purifikasi protein antibakteri menggunakan kromatografi kolom *Anion Exchanger* dan gel filtrasi serta pemurnian dengan Native-polyacrilamide gel elektroforesis; (5) Penentuan konsentrasi hambatan minimal protein antibakteri; (6) Karakterisasi protein antibakteri meliputi berat molekul, kandungan asam amino, pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas protein antibakteri; 7. Uji sifat kerja protein antibakteri dari cacing tanah.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel

Sampel cacing tanah diperoleh dari daerah Kota Kabupaten Jember pada ketinggian ± 100 m di atas permukaan air laut, kemudian diidentifikasi dan dibudidayakan di laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember. Sampel yang digunakan adalah tiga jenis cacing tanah yaitu: *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis*, *Pontoscolex corethrurus* dewasa berumur lebih dari 5 bulan, sehat dan masing-masing beratnya 200 gram.

4.3 Definisi Operasional Variabel

1. Uji aktivitas antibakteri adalah uji daya hambat ekstrak protein dari cacing tanah terhadap pertumbuhan bakteri Gram negatif dan Gram positif menggunakan metode difusi agar.
2. Zona hambatan adalah diameter zona jernih di sekitar sumuran/ pencadangan pada lempeng agar bakteri uji dalam satuan milimeter.
3. Protein antibakteri adalah protein aktif yang mampu menghambat pertumbuhan terhadap bakteri uji.
4. Bakteri Gram negatif yang digunakan adalah *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri Gram positif yang digunakan adalah *Bacillus subtilis*.
5. Berat molekul protein antibakteri adalah berat molekul protein antibakteri yang diestimasi dengan SDS-PAGE, dinyatakan dalam satuan Dalton.
6. pH optimum protein antibakteri adalah derajat keasaman yang memberikan aktivitas protein antibakteri secara maksimum terhadap penghambatan bakteri uji.
7. Suhu optimum protein antibakteri adalah suhu yang memberikan aktivitas penghambatan secara maksimum terhadap bakteri uji dinyatakan dengan derajat Celcius.

4.4 Bahan Penelitian

- Mikroba uji

Mikroba uji yang digunakan adalah : *Salmonella typhi* WHO 04, *Shigella dysenteriae* WHO 06, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* WHO 44, yang sudah

diidentifikasi dan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Departemen Kesehatan Surabaya.

- Bahan kimia

Natrium klorida, amonium sulfat, amonia 10%, asam klorida 2N, natrium hidroksida, asam sulfat pekat, asam sulfat, natrium asetat, larutan garam fisiologi steril, larutan bufer MOPS, bufer fosfat, etanol teknis, sephadex G-25, sephadex G-100, silika gel 60, cellulose gel, dimetil sulfoksida D2, tetrametilsilan (TMS), aluminium klorida, bahan SDS-PAGE, bahan native-PAGE, DEAE Sephacel, membran dialisis. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian semuanya dengan derajat pro analisa, kecuali dinyatakan lain.

4.5 Instrumen Penelitian

Inkubator Type: BM 500 F.-Nr: 980676, Autovortex mixer SA1, Laminar airflow Dalton, Micropipette soccorex SWISS Made, Rotavapor: Buchi R-114, Kromatografi kolom, Hewlett Packard series 1050, Satu set alat SDS-PAGE, Spektrofotometer UV-VIS Shimadzu, Autoclave SH 300 Yamato, Mikroskop binokuler XSZ, Sonicator 30 get/det, Inkubator SI 50, timbangan analitik Sartorius Portble, Sentrifuge Fisher model 59, Amino acid analyzer model 835 high speed.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi budidaya dan identifikasi cacing tanah di Laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember, mulai 1 Agustus 2000, dengan bibit 1kg cacing tanah.

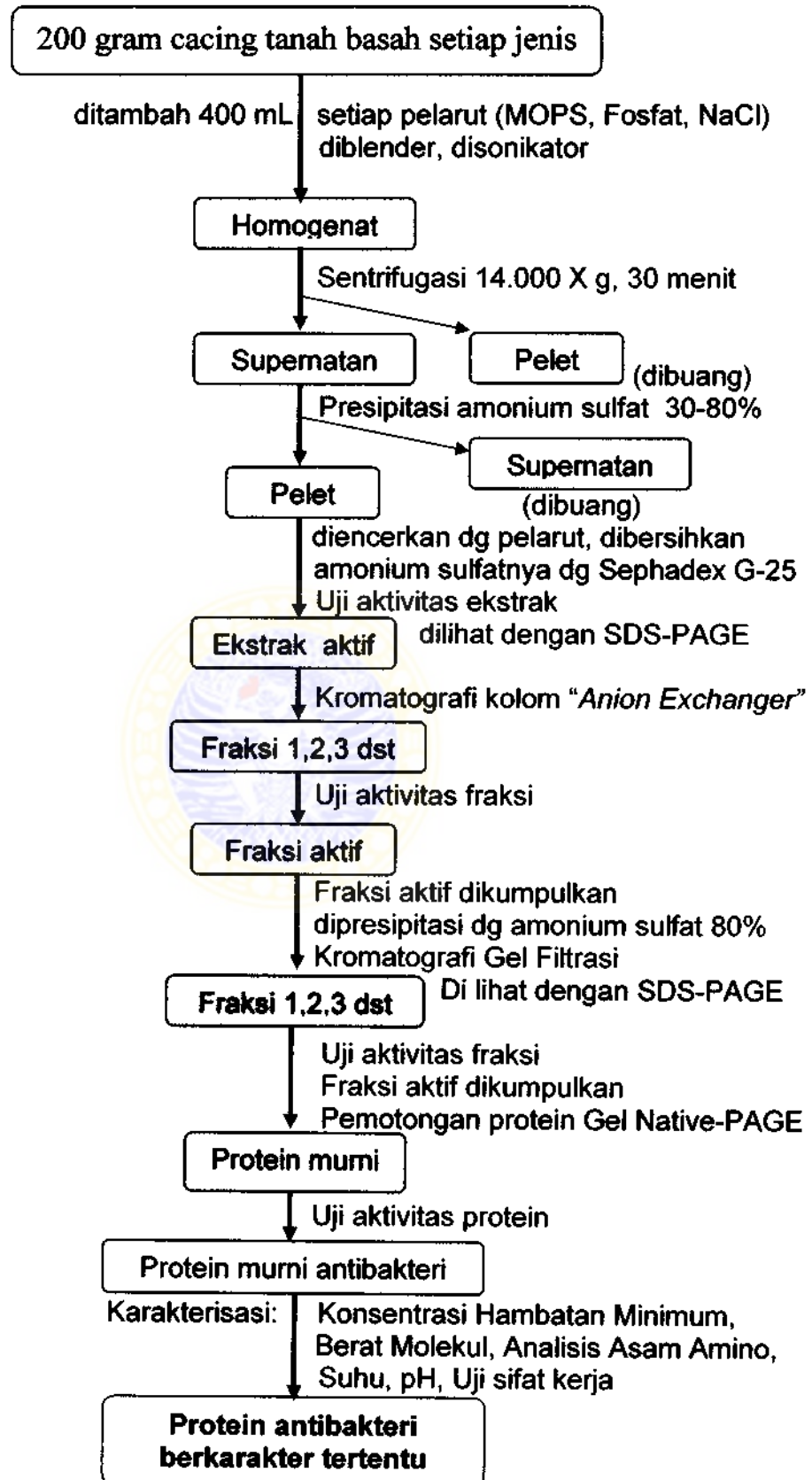
Uji pendahuluan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi dan Tropical Disease Centre Universitas Airlangga. Pembuatan ekstrak Cacing tanah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi F.MIPA Universitas Jember. Purifikasi, karakterisasi, pengukuran kandungan protein, spektrometer, kromatografi, SDS-PAGE di Laboratorium Biologi Molekul Universitas Jember dan *Amino Acid Analyzer* di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga.

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Identifikasi cacing tanah

Cacing tanah yang diperoleh di daerah Jember, diidentifikasi di Laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember. Identifikasi dilakukan dengan dua cara yaitu secara mikroskopis/anatomi dengan melihat ciri-ciri organ dalam tubuh, dan cara makroskopis/morfologi dengan memperhatikan letak klitelum, warna tubuh, letak seta, banyaknya seta, banyaknya segmen, bentuk mulut dan bentuk tubuh. Identifikasi menggunakan buku acuan Gates (1947) dan Lofty (1972). Hasil identifikasi kemudian dibudidayakan di laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember.

Bagan kerangka operasional dapat digambarkan seperti (Gambar 4.1) di bawah ini.



Gambar 4.1 Bagan kerangka operasional

4.7.2 Pembuatan ekstrak cacing tanah

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara memilih cacing tanah yang sudah dewasa, umur lebih dari lima bulan dan bergerak dengan lincah (sehat). Tiga macam cacing tanah segar yang telah dibersihkan dari kotoran/tanah dengan air suling yaitu: *Pheretima javanica*, *Pontoscolex coretrurus* dan *Pheretima capensis* masing-masing ditimbang 200 gram, kemudian diekstrak dalam tiga macam pelarut (NaCl, MOPS, bufer sulfat). Ekstraksi dilakukan dengan cara mencampur 200 gram cacing tanah dan 400 mL pelarut, kemudian diblender, dihomogenkan dengan sonikator sampai seluruh sel pecah menjadi homogenat. Masing-masing homogenat disentrifugasi 14.000 X g selama 30 menit suhu 4⁰C, supernatan yang dihasilkan dipresipitasi dengan amonium sulfat 30%-80%, kemudian disentrifugasi 14.000 X g selama 30 menit suhu 4⁰C, pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam pelarut steril, kemudian amonium sulfatnya dipisahkan dengan kolom Sephadex G-25, didapatkan sembilan macam ekstrak. Setiap ekstrak dilihat kandungan proteinnya dengan uji *Bradford* dan dilakukan uji aktivitas ekstrak.

4.7.3 Uji aktivitas ekstrak protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak protein dari cacing tanah dilakukan setiap tahapan. Semua pekerjaan uji aktivitas antibakteri dilakukan secara aseptik di dalam laminar air flow.

Langkah-langkah uji aktivitas antibakteri : Penyiapan ekstrak dari tiga macam cacing tanah yang dilarutkan dalam 3 macam pelarut, sehingga didapatkan sembilan macam ekstrak.

Penyiapan media: disiapkan dua buah tabung reaksi, masing-masing berisi media agar nutrisi steril sebanyak 7,5 mL (untuk *seed layer*) dan media nutrisi agar steril sebanyak 12,5 mL (untuk *base layer*), ini digunakan untuk satu macam bakteri.

Penyiapan inokulum bakteri uji: diambil 1 Ose biakan murni bakteri uji dari stok biakan digoreskan pada agar miring. Tabung disimpan di dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Larutan garam fisiologis steril sebanyak 5 mL ditambahkan ke dalam tabung, dikocok sampai seluruh biakan terlepas dari agar. Larutan inokulum bakteri diukur dengan spektrofotometer pada λ 580 nm hingga diperoleh transmittansi 25% (bila perlu dilakukan pengenceran).

Uji potensi antibakteri : 12,5 mL media nutrisi yang telah dicairkan (suhu 45°C - 50°C) dalam tabung *base layer* dituangkan ke dalam cawan petri steril, dibiarkan memadat. Dimasukkan 10 μ L inokulum bakteri uji ke dalam tabung *seed layer* yang berisi 7,5 mL media nutrisi yang telah dicairkan (suhu 45°C - 50°C), dikocok dengan vortex selanjutnya dituang secara merata di atas permukaan *base layer* di dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Sumuran dibuat pada agar dengan pipa pencetak agar atau meletakkan ring dengan posisi yang teratur. Masing-masing lubang/ring tersebut diisi dengan larutan uji dan larutan standar (50 μ L untuk lubang, 250 μ L untuk ring) sesuai tempatnya, kemudian cawan petri disimpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur diameter daerah hambatan yang terbentuk dengan jangka sorong untuk 5 macam bakteri uji (Ju Hyun, 1998). Ekstrak antibakteri yang didapat dilanjutkan

dengan purifikasi protein antibakteri. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan untuk setiap tahapan purifikasi.

4.7.4 Purifikasi protein cacing tanah

4.7.4.1 Pemisahan protein cacing tanah dengan kromatografi kolom DEAE sephacel (*anion exchanger*)

Ekstrak protein antibakteri dari cacing tanah yang diperoleh dipisahkan dengan kromatografi kolom DEAE Sephacel (*Anion Exchanger*). Kolom DEAE panjangnya 70 cm dan diameter 2,5 cm dipasang dengan standar penjepit, kemudian bahan DEAE dimasukkan dalam kolom sedikit demi sedikit sampai ketinggian 55 cm. Selanjutnya larutan sampel dimasukkan kolom di atas bahan DEAE, kemudian dialiri bufer 0,50 mM MOPS tetes demi tetes. Fraksi yang keluar ditampung dalam kolektor fraksi setiap 2 mL, setelah tetesan fraksi tidak mengandung protein yang dilihat dengan spektrofotometer, dialirkan tetes demi tetes 0,5 M NaCl ke dalam bufer MOPS, supaya homogen dicampur dengan stirer, NaCl berfungsi untuk mengganti protein bermuatan positif yang terikat dalam DEAE. Protein akan keluar dari ikatan DEAE. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dilihat kandungan proteinnya dengan spektrofotometer melalui pengamatan absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm (Murray,1994). Dibuat grafik hubungan antara kandungan protein dan nomor fraksi dan hasil uji aktivitas, sehingga didapatkan fraksi protein antibakteri. Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah dikumpulkan, dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%. Pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam bufer MOPS dan dilewatkan sephadex G-25. Fraksi protein antibakteri dikumpulkan dan dipisahkan dengan kolom kromatografi filtrasi Sephadex G-100.

4.7.4.2 Pemisahan protein cacing tanah dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 (Filtrasi)

Pemisahan Protein dilakukan dengan kromatografi kolom filtrasi sephadex G-100, kemudian ditampung dengan fraksi kolektor, fraksi-fraksi yang dihasilkan diuji aktivitasnya, didapatkan fraksi protein antibakteri dari cacing tanah (Murray, 1994).

Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah dikumpulkan, dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%, pelet yang dihasilkan diencerkan dengan bufer MOPS, dilewatkan sephadex G-25, dan selanjutnya fraksi protein antibakteri dimurnikan dengan Native-PAGE.

4.7.4.3 Pemurnian protein cacing tanah dengan Native-PAGE

Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah hasil kromatografi kolom Sephadex G-100 (Filtrasi) dilewatkan pada native-PAGE, dengan metode yang sama dengan SDS-PAGE tanpa SDS, sampel tidak dipanaskan dan tidak diwarnai, hanya bagian tepi saja dipotong terus diwarnai. Setelah selesai diwarnai disejajarkan untuk acuan tempat memotong, kemudian hasil potongan gel yang ada proteinnya dikeluarkan dari gel dengan cara dimasukkan dalam kantong membran dialisis, dielektroforesis selama ± 8 jam, selanjutnya masing-masing protein yang didapat diuji aktivitasnya (Murray, 1994).

4.7.5 Uji aktivitas protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri

Uji aktivitas protein dari cacing tanah dilakukan untuk setiap tahapan. Semua pekerjaan uji aktivitas antibakteri dilakukan secara aseptik di dalam ruang steril (Laminar air flow).

Langkah-langkah uji aktivitas protein dari cacing tanah dilakukan seperti pada uji aktivitas ekstrak cacing tanah (4.7.3).

4.7.6 Penentuan konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri dari cacing tanah terhadap bakteri uji

Dibuat berbagai macam konsentrasi protein antibakteri mulai dari 160,0; 80,0; 40,0; 20,0 sampai 10,0 $\mu\text{g/mL}$, diujikan terhadap 5 macam bakteri uji, dengan metode difusi agar media nutrisi menggunakan sumuran sebagai pencadangan, tiap sumuran berisi 50 μl sampel, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , diamati aktivitasnya (Ju Hyun, 1998).

4.7.7 Karakterisasi protein antibakteri dari cacing tanah

4.7.7.1 Penentuan berat molekul protein antibakteri dengan SDS- PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektro-phoresis)

1) Preparasi bahan SDS-PAGE

Larutan A (100 mL): ditimbang 29,2 gram akrilamid dan 0,8 gram bis-akrilamid dilarutkan dalam 70 mL air suling. Setelah larut volume dijadikan 1000 mL, disaring dan divakumkan, disimpan pada suhu 4°C .

Larutan B (100 mL): Larutan 1,5 Tris-HCl pH 8,8 dan 0,4% SDS (bufer untuk gel penyusun), dilarutkan 18,2 gram Tris dan 0,4 gram SDS dalam 80 mL air suling dan pH diatur 8,8 dengan HCl, ditambah air sampai 100 mL, disimpan pada suhu 4°C .

Larutan C (100 mL); Larutan 0,5 M Tris-HCl pH 6,5 dan 0,4% SDS (bufer gel pemisah) larutan 6,1 gram Tris dan 0,4 gram SDS dalam 80 mL air suling dan pH diatur 6,8 dengan HCl, ditambah air sampai volume 100 mL dan disimpan pada suhu 4°C .

Katalis 10% Amonium Per Sulfate (APS) dilarutkan dalam 10 mL air suling (1 gram APS/10 mL) disimpan pada suhu -20°C . TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine), digunakan tanpa diencerkan dari larutan persediaan.

2) Pembuatan gel

Digunakan peralatan bersih yang sudah dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air suling untuk menghindari kontaminasi protein lain, bila perlu menggunakan sarung tangan.

Alat-alat pencetak gel dirangkai sesuai dengan petunjuk manual. Ketebalan yang digunakan 1 mm dan jumlah larutan untuk gel pemisah 15%, gel penyusun 4,5%.

Dibuat gel pemisah 12,5% (Akrilamid 8,3 mL, Lower gel 5,0 mL, H_2O 6,6 mL, TEMED 10 μL) dan gel penyusun 4,5% (Akrilamid 0,9 mL, Uper gel 1,5 mL, H_2O 3,6 mL, TEMED 9,0 μl) dengan ketebalan 1 mm serta ukuran gel medium. Larutan dicampur dalam erlemeyer.

Larutan dituang segera pada alat pencetak gel dan disisakan tempat untuk membuat gel penyusun. Segera ditambahkan air di atasnya untuk mempercepat terjadinya polimerisasi akrilamid.

Apabila gel pemisah telah padat, air di atasnya dibuang, dan ditambahkan campuran formula untuk membuat gel penyusun tersebut di atasnya.

Dipasang sisir/comb sesuai dengan yang dikehendaki dan dibiarkan beberapa saat supaya gel berpolimerisasi dan memadat.

3) Preparasi bufer sampel protein

Larutan sampel protein antibakteri yang akan dielektroforesis diambil sebanyak 100 μ l dalam *ependorf tube*. Ditambah volume yang sama 2 X stok sampel bufer (konsentrasi akhir sampel bufer 0,06M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Gliseril, 0,025% bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol.

Persediaan sampel bufer dapat disimpan pada suhu 4°C tanpa 2-mercaptoethanol. Mercaptoethanol ditambahkan apabila akan digunakan.

Dipanaskan campuran tersebut pada suhu 100°C selama 3 menit.

4) Elektroforesis

Komponen aparatus elektroforesis dirangkai sesuai dengan petunjuk dan diyakinkan bahwa tidak akan terjadi kebocoran pada tangki larutan bufer di atas.

Tangki diisi secukupnya dengan larutan bufer elektroda. Komponen bufer elektroda terdiri dari: bufer elektroda / *running bufer*. Dibuat 5 x konsentrasi bufer elektroda dengan komposisi 15 gram Tris, 72 gram Glisin, 5 gram SDS dilarutkan dalam 1 liter air, pH dikontrol dengan kertas lakmus kurang lebih pH 8,3 (\pm 0,2). Disimpan larutan 5 x konsentrasi elektrode bufer pada botol gelap pada suhu kamar. Diambil 5 x konsentrasi bufer sebanyak 200 mL dan diencerkan dengan air suling sampai volume 1000 mL.

Dimasukkan sampel protein yang telah disiapkan dalam sumur-sumur (*wel*) yang terbentuk karena sisir pada gel penyusun. Satu sampel satu lubang, dijaga agar tidak menumpahkan sampel pada lubang yang lain.

Setelah semuanya dilakukan, dihubungkan elektroda yang ada pada bufer atas dan bufer bawah dengan katup negatif dan positif yang dihasilkan oleh *supllay power*. Digunakan voltase rendah pada tahap gel penyusun dan

dapat dinaikkan sampai ± 100 volt apabila sampel telah mencapai gel penyusun. Elektroforesis dinyatakan selesai apabila warna biru telah mencapai $\pm 0,5$ cm dari bagian bawah gel.

5) Pengecatan protein

Setelah selesai elektroforesis pita protein dapat divisualisasi menggunakan larutan cat CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) atau silver. Dalam hal ini akan digunakan pengecatan dengan CBB.

Gel diangkat dari lempeng kaca dan dimasukkan dalam larutan CBB (larutan pewarna), digojok perlahan-lahan sampai warna CBB dapat diikat oleh protein. Pencucian CBB yang tidak terikat protein dengan larutan pencuci dilakukan sampai *band* (pita) protein nampak jelas. menggunakan pengocok untuk mempercepat penghilangan CBB.

Sebagai larutan pewarna (CBB) digunakan 0,1% *Coomassie Brilliant Blue R-25* (w/v) dalam Metanol 40% (v/v), dan 10% asam asetat (v/v). CBB dilarutkan dahulu dalam metanol p.a., kemudian ditambah air suling dan asam asetat sesuai kebutuhan, disimpan pada suhu kamar. Larutan pencuci: dibuat dari larutan 40% metanol dan 10% asam asetat (Murray, 1994).

4.7.7.2 Analisis asam amino protein cacing tanah dengan AAA (*Amino Acid Analyzer*)

Ditimbang ± 1.0 mg protein sampel, dimasukkan tabung tertutup. Ditambahkan 1.0 mL HCL 6 N ke dalam tabung dan dialiri dengan gas nitrogen. Sampel dihidrolisis dengan cara dimasukkan oven selama 22 jam pada suhu 110°C (hidrolisis dengan HCL menyebabkan sistein dan metionin rusak, sehingga hasil tidak kuantitatif). Setelah 22 jam, sampel dikeringkan dengan gas nitrogen sambil direndam air hangat ($\pm 40^{\circ}\text{C}$). Untuk analisis

sampel selanjutnya ditambah 0,5 mL NaOH 0,02 N didiamkan selama 4 jam pada suhu kamar untuk mengoksidasi sistein menjadi sistin ke dalam campuran. Ditambahkan 1,5 mL HCL 0,01 N dan di ultrasonik selama 5 menit. Cairan sampel disaring dengan filter Whatman 0,2 µm dan siap untuk dianalisis. Untuk analisis satu sampel diperlukan waktu 144 menit (± 2,5 jam).

Cara kerja alat AAA (*Amino Acid Analyzer*)

1. Prinsip kerja alat adalah sistem HPLC: Dilakukan gradien elusi dengan 4 macam bufer dan 1 macam cairan untuk regenerasi kolom, kecepatan alir : 0,225 mL/min (bufer) dan 0,3 mL /min (ninhidrin). Kolom resin penukar kation (*cation exchanger*) 4,6 x 150 nm; suhu 53⁰C, resin filter amonia 4 x 5,0 nm. Untuk deteksi digunakan: pereaksi warna ninhidrin (suhu 96⁰C) (*post coloumn reaction*) diamati pada panjang gelombang 570 nm, untuk semua asam amino akan berwarna keunguan, kecuali prolin pada 440 nm berwarna kekuningan.
2. Perhitungan hasil analisis :

$$\% \text{ Kadar (b/b)} = \frac{\text{nanogram} \times 40^* \times 100\%}{\text{berat sampel (nanogram)}}$$

Keterangan :

40* = berasal dari sampel yang diencerkan dengan NaOH dan HCL 2mL; sedangkan secara otomatis alat mengisap sampel 50 µl.
(Aniek, 1992).

BAB. 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Cacing Tanah

5.1.1 Identifikasi *Pheretima javanica*

Pheretima javanica merupakan cacing tanah yang banyak ditemukan dan mempunyai hirarkhi taksonomi sebagai berikut:

Filum : Annelida

Kelas : Chaetopoda

Ordo : Oligochaeta

Famili : Megascolecidae

Marga : *Pheretima*

Jenis : *Pheretima javanica* (Kinberg).

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa *Pheretima javanica* mempunyai ciri morfologi bentuk bulat, panjang 145–255 mm, diameter 3-5 mm dan jumlah segmen 102-127. Warna bagian dorsal agak kehitaman dan *iridescent*, bagian anterior lebih hitam dari bagian posterior, bagian ventral berwarna coklat muda sampai keputih-putihan. Lubang dorsal mulai pada septa 12/13, seta mulai pada segmen II dari tipe perikitin. klitelum seperti cincin, terletak pada segmen 14-16, warnanya keabu-abuan sampai coklat kehitaman. Lubang kelamin jantan sepasang terdapat pada segmen 18, lubang ini agak menonjol keluar, seperti bibir yang melingkar, di antara lubang kelamin terdapat 6-8 seta berupa rambut keras dari khitin, berguna sebagai alat gerak cacing tanah. Lubang kelamin betina terdapat pada bagian medio-ventral segmen 14. Lubang spermatika kurang jelas, ada dua

Hasil pengamatan anatomi *Pheretima javanica* Empedal (*gizzard*) *P. javanica* berbentuk seperti lonceng dan terletak antara septa 7/8 dan 10/11. Usus mulai pada segmen 15, usus buntu terletak memanjang mulai segmen 27 menuju segmen 24 dan bentuknya sederhana. Testis terletak dalam sepasang kantung di segmen 10 dan 11. Vesika seminalis besar, berpasangan, melengkung sampai ke dorsal dan mengisi seluruh rongga tubuh di segmen 11 dan 12. Kelenjar prostata seperti mayang, terletak pada segmen 17-20, bagian pangkalnya menempel pada segmen 18, seluruhnya menyerupai huruf s atau c. Saluran spermatika lebih pendek dari divertikulum dan bentuk divertikulumnya panjang berbelit-belit (Sims dan Easton, 1972). Ciri-ciri anatomi *P. javanica* dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Anatomi *Pheretima javanica* yang digunakan dalam penelitian.
(1). Empeda, (2). Testis, (3). vesika seminalis, (4). Klitelum,
(5). kelenjar prostata, (6). usus buntu

5.1.2 Identifikasi *Pontoscolex corethrurus* (Fr. Mull.)

Pontoscolex corethrurus merupakan cacing tanah dengan hirarkhi taksonomi sebagai berikut:

Filum : Annelida

Kelas : Chaetopoda

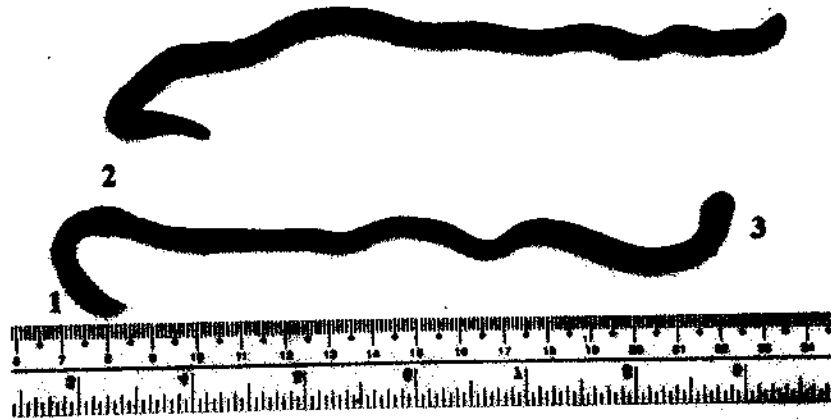
Ordo : Oligochaeta

Famili : Glossoscolecidae

Marga : *Pontoscolex*

Jenis : *Pontoscolex corethrurus* (Fr. Mull.)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa morfologi *Pontoscolex corethrurus* mempunyai ciri bentuk gilik, panjang 66mm-190mm, diameter 2mm-3,5mm, segmen 182-202. Warna keputih-putihan dengan sedikit kecoklatan, bagian kepala kemerahan. Protomium dan segmen I terletak tertarik ke dalam. Seta empat pasang pada tiap segmen, dari tipe *lumbricine*, seta bagian anterior letaknya masing-masing pasangan berdekatan, segmen X dan XI mulai menjauh, seta bagian ventral tersusun bergantian mendekat-menjauh, seta bagian posterior lebih besar sehingga lebih jelas terlihat. Nefridia pada seta c. Klitelum pada segmen XV atau XVI sampai segmen XXII atau XXIII, dinding klitelum bagian dorsal menebal mulai seta b, masih terlihat jelas segmen-segmennya, warnanya kekuning-kuningan. Lubang spermateka tiga pasang dan terletak pada septa 6/7-8/9 pada seta c. Lubang kelamin jantan pada septa 20/21 atau di belakangnya, di daerah klitelum (Sims dan Easton, 1972).



Gambar 5.3 Morfologi *Pontoscolex corethrurus* yang digunakan dalam penelitian. (1). kepala, (2). klitelum, (3). ekor

Pontoscolex corethrurus mempunyai ciri-ciri anatomi septa 5/6-10/11 tebal dan kuat, terutama bagian anteriornya. Empedal bentuknya seperti lonceng yang terletak pada segmen IV-VI. Vesika seminalis sangat panjang. Jantung terakhir pada segmen XI. Meganefridia satu pasang pada tiap-tiap segmen. Ovarium pada segmen XIV. Usus buntu mulai dari segmen 57 menuju ke segmen 54. Spermatika seperti silinder dan tidak mempunyai divertikulum (Sims dan Easton, 1972).

5.1.3 Identifikasi *Pheretima capensis* (Horst)

Pheretima capensis termasuk cacing tanah yang mempunyai hirarkhi taksonomi sebagai berikut:

Filum : Annelida

Kelas : Chaetopoda

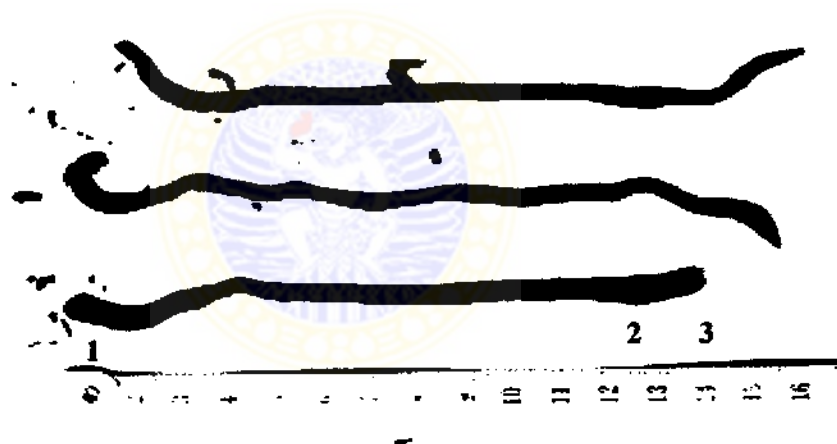
Ordo : Oligochaeta

Famili : Megascolecidae

Marga : *Pheretima*

Jenis : *Pheretima capensis* (Horst)

Pheretima capensis mempunyai ciri morfologi panjang 110-135 mm, diameternya 3,0-4,5 mm, jumlah segmen 101-117. Warna bagian dorsal coklat tua, bagian ventral coklat muda sampai keputih-putihan. Prostomium epilobus (1/2). Lubang dorsal mulai septa 12/13. Seta mulai segmen II, tipe perikitin. Klitelum seperti cincin dan warnanya sedikit lebih hitam dari tubuhnya, terletak pada segmen XIV-XVI. Lubang kelamin jantan pada segmen XVIII, agak menonjol ke permukaan, bentuknya seperti bibir melingkar, antara dua lubang terdapat 6-8 seta. Lubang kelamin betina di bagian ventral segmen XIV. Lubang spermateka terletak pada septa 7/8 dan 8/9. Papila genital tidak ada. (Sims dan Easton, 1972).



Gambar 5.4 Morfologi *Pheretima capensis* yang digunakan dalam penelitian (1). ekor, (2). klitelum, (3). kepala.

Pheretima capensis mempunyai ciri anatomi Septa 5/6-7/8, 10/11 dan 11/12 tebal dan kuat, septa 8/9 dan 9/10 tidak ada. Empedal seperti lonceng dan terletak antara septa 7/8 sampai 10/11. Usus mulai segmen XV, usus buntu mulai segmen XXVI menuju ke segmen XXIV. Kantung testis pada segmen X dan XI. Vesika seminalis besar, berpasangan, melengkung sampai ke bagian dorsum, mengisi seluruh ruangan tubuh di

segmen XI dan XII. Jantung terletak pada segmen X-XIII. Kelenjar protata seperti mayang yang terbagi atas lobus-lobus terletak pada segmen XVI-XIX, salurannya seperti huruf U dan bermuara pada kantung kopulatori di segmen XVIII. Kantung kopulatori tidak berkelenjar. Ampula dan saluran spermateka tidak lebih pendek dari divertikulum, divertikulumnya agak membesar di bagian ujungnya dan tidak berbelit (Sims dan Easton, 1972).

5.2 Hasil Pembuatan Ekstrak Protein Dari Cacing Tanah

Ekstrak protein dibuat dari tiga jenis cacing tanah yaitu *Pheretima javanica*, *Pontoscolex corethrurus*, *Pheretima capensis* masing-masing seberat 200 gram dalam tiga macam pelarut ekstrak protein yaitu: 0,9% NaCl, 0,50mM bufer MOPS pH 7, bufer fosfat pH 7,2, masing-masing 400mL. Kemudian diblender, disonikator, disentrifuge dan protein dalam supernatan yang dihasilkan diendapkan dengan amonium sulfat 30% - 80%. Hasil pengendapan protein ada sembilan macam berupa pelet (endapan protein) yang beratnya bervariasi antara 18 – 21,5 gram (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Ekstrak protein dari tiga jenis cacing tanah dengan pelarut 0,9% NaCl; 0,50mM MOPS; bufer fosfat pH 7,2. (Ph) *Pheretima*; (P)*Pontoscolex*.

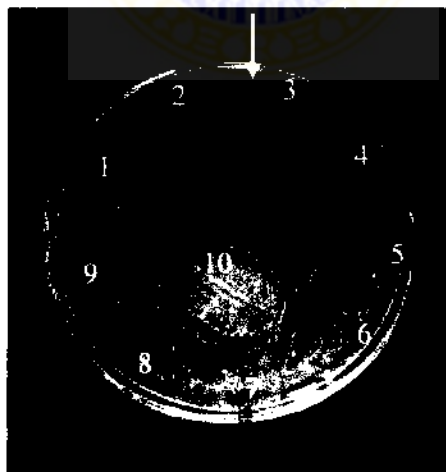
No.	Jenis Cacing Tanah	Pelarut	Berat cacing/pelarut	Hasil Ekstrak
1.	<i>Ph. javanica</i>	0,9% NaCl	200gr / 400mL	19,0 gr
2.	<i>Ph. javanica</i>	Fosfat pH 7,2	200gr / 400mL	21,5 gr
3.	<i>Ph. javanica</i>	0,50 mM MOPS	200gr / 400mL	20,0 gr
4.	<i>P. corethrurus</i>	0,9% NaCl	200gr / 400mL	18,5 gr
5.	<i>P. corethrurus</i>	Fosfat pH 7,2	200gr / 400mL	19,0 gr
6.	<i>P. corethrurus</i>	0,50 mM MOPS	200gr / 400mL	20,0 gr
7.	<i>Ph. capensis</i>	0,9% NaCl	200gr / 400mL	18,0 gr
8.	<i>Ph. capensis</i>	Fosfat pH 7,2	200gr / 400mL	19,0 gr
9.	<i>Ph. capensis</i>	0,50 mM MOPS	200gr / 400mL	17,5 gr

Tabel di atas menunjukkan bahwa endapan protein cacing tanah yang dibuat dari tiga jenis cacing tanah dalam tiga macam pelarut menghasilkan sembilan macam endapan protein. Untuk uji aktivitas antibakteri, sembilan macam endapan protein tersebut dihilangkan amonium sulfatnya dengan kromatografi Sephadex G-25. Protein yang terelusi dari kolom tersebut digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

5.3 Uji Aktivitas Ekstrak Protein Dari Cacing Tanah yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar nutrien. Dari sembilan macam endapan protein tiga jenis cacing tanah dan tiga macam pelarut protein yang diujikan, ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dalam pelarut bufer 0,5 mM MOPS mempunyai zona hambatan lebih lebar dibanding yang lain (Gambar 5.5). Gambar 5.5 merupakan salah satu dari 5 macam bakteri uji, data lengkap tersaji pada tabel 5.2.

Terlebar zona hambatnya



Salmonella typhi

Gambar 5.5 Uji aktivitas antibakteri ekstrak protein dari cacing tanah dengan metode difusi agar. Tiap sumur berisi 40 μ L dengan konsentrasi 50 μ g/mL ekstrak protein dari cacing tanah.

Sumur no. 1 s/d no. 10 berturut-turut ekstrak protein dari :
Ph. javanica dengan 0,9% NaCl (1), fosfat pH 7,2 (2), 0,50 mM MOPS (3),
P. corethrus dengan 0,9% NaCl (4), fosfat pH 7,2 (5), 0,50 mM MOPS (6),
Ph. capensis dengan 0,9% NaCl (7), fosfat pH 7,2 (8), 0,50 mM MOPS (9),
 dan Kontrol pelarut protein (10).

Apabila uji aktivitas endapan protein dari cacing tanah terhadap penghambatan pertumbuhan berbagai macam bakteri uji dengan mengukur diameter zona hambatan, maka data yang diperoleh secara keseluruhan disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Uji aktivitas antibakteri ekstrak protein dari cacing tanah dengan metode difusi agar pada media nutrisi.

No	Jenis ekstrak protein	φ zona hambatan (mm)				
		<i>St</i>	<i>Sd</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Bs</i>
1.	Ekstrak <i>Ph. javanica</i> dlm 0,9% NaCl	8,0	9,0	8,0	7,5	10,0
2.	Ekstrak <i>Ph. javanica</i> dlm fosfat pH 7,2	7,0	8,0	8,0	8,0	9,0
3.	Ekstrak <i>Ph. javanica</i> dlm 0,5 mM MOPS	10,0	12,0	13,0	11,0	14,0
4.	Ekstrak <i>P. corethrus</i> dlm 0,9% NaCl	7,0	8,0	7,5	8,0	9,0
5.	Ekstrak <i>P. corethrus</i> dlm fosfat pH 7,2	7,0	7,0	6,0	7,0	8,0
6.	Ekstrak <i>P. corethrus</i> dlm 0,5mM MOPS	7,0	8,5	8,0	9,0	10,0
7.	Ekstrak <i>Ph. capensis</i> dlm 0,9% NaCl	-	4,5	5,0	6,0	7,5
8.	Ekstrak <i>Ph. capensis</i> dlm fosfat pH 7,2	-	5,0	4,5	5,0	8,0
9.	Ekstrak <i>Ph. capensis</i> dlm 0,5 mM MOPS	6,5	7,0	6,0	6,0	9,0
10	Kontrol pelarut ekstrak protein	-	-	-	-	-

Keterangan : *St* = *Salmonella typhi* *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*
Sd = *Shigella dysenteriae* *Bs* = *Bacillus subtilis*
Ec = *Escherichia coli* - = tidak ada hambatan
Ph = *Pheretima* *P* = *Pontoscolex*

Dari Tabel di atas tampak bahwa ekstrak protein dari *Pheretima javanica* mempunyai zona hambat terbesar dibanding *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrus*. Pelarut bufer MOPS merupakan pelarut yang paling sesuai untuk protein cacing tanah dibanding pelarut lainnya, karena bufer MOPS mempunyai daya larut protein lebih tinggi dan kemampuan mempertahankan pH lebih stabil dibanding pelarut lain.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak protein yang paling besar zona hambatannya adalah ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dengan pelarut bufer MOPS. Zona hambatan untuk bakteri *S.typhi*, *S.dysenteriae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* dan *B.subtilis* masing-masing adalah: 10; 12; 13; 11 dan 14 mm (Tabel 5.2 no.3). Karena ekstrak protein yang paling aktif sebagai antibakteri didapat dari ekstrak protein dari *Pheretima javanica*, maka untuk purifikasi lebih lanjut dilakukan hanya pada ekstrak protein dari *Pheretima javanica*.

5.4 Purifikasi Protein Dari Cacing Tanah yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Untuk purifikasi protein dilakukan dengan mengekstrak protein dari cacing tanah *Pheretima javanica* dengan bufer 0,5 mM MOPS. Ekstrak protein kemudian diendapkan dengan amonium sulfat 30-80%. Sebelum difraksinasi dengan kromatografi kolom DEAE Sephacel (*Anion Exchanger*), amonium sulfat dihilangkan dengan kromatografi Sephadex G-25.

5.4.1 Fraksinasi ekstrak protein dari cacing tanah melalui kromatografi kolom DEAE Sephacel (*Anion Exchanger*)

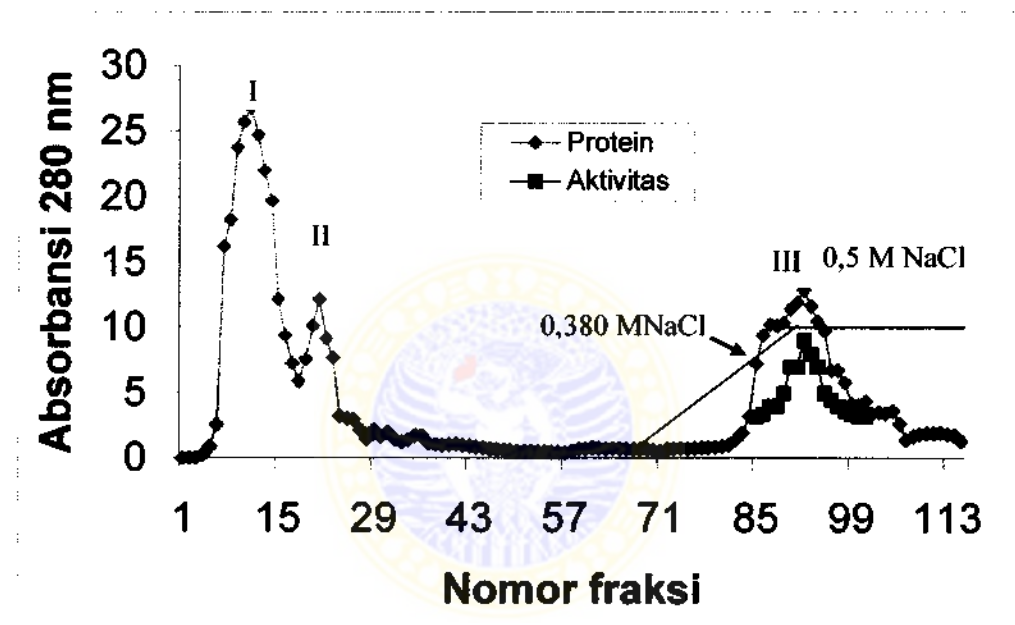
Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom DEAE didapatkan 114 fraksi. Pengukuran kandungan protein dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm menghasilkan tiga puncak kelompok protein, yang terdiri dari puncak I (fraksi 6-17), puncak II (fraksi 19-23) dan puncak III (fraksi 85-101). Ketiga puncak kelompok protein tersebut diuji aktivitasnya dengan metode difusi agar. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa puncak I dan puncak II tidak mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, sedang puncak ke III mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Tabel 5.3 dan Gambar 5.6).

Tabel 5.3 Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom DEAE dan pengukuran kandungan protein tiap fraksi dengan spektrofotometer pada λ 280 nm serta uji aktivitas dengan metode difusi agar nutrisi.

No. Frak Si	Abs 280 (nm)	Akti Vitas (ϕ mm)	No. Frak si	Abs 280 (nm)	Akti Vitas (ϕ mm)	No. Frak Si	Abs 280 (nm)	Akti Vitas (ϕ mm)
1	0	0	39	1,04	0	77	0,75	0
2	0,02	0	40	0,99	0	78	0,79	0
3	0,04	0	41	1,01	0	79	0,83	0
4	0,29	0	42	1,06	0	80	0,85	0
5	0,88	0	43	0,98	0	81	0,93	0
6	2,57	0	44	0,92	0	82	0,96	0
7	16,23	0	45	0,83	0	83	1,42	0
8	18,24	0	46	0,78	0	84	1,92	0
9	23,71	0	47	0,69	0	85	5,62	3,2
10	25,71	0	48	0,64	0	86	7,23	3,4
11	26,76	0	49	0,59	0	87	9,41	4,0
12	24,73	0	50	0,56	0	88	10,24	4,0
13	21,96	0	51	0,54	0	89	10,12	5,0
14	19,68	0	52	0,53	0	90	10,34	6,0
15	12,20	0	53	0,51	0	91	11,42	7,0
16	9,38	0	54	0,49	0	92	11,92	7,0
17	7,25	0	55	0,48	0	93	12,87	9,0
18	5,91	0	56	0,47	0	94	10,44	8,0
19	7,61	0	57	0,46	0	95	9,72	5,0
20	10,12	0	58	0,42	0	96	6,73	4,5
21	12,15	0	59	0,53	0	97	6,73	4,0
22	9,17	0	60	0,74	0	98	6,73	3,6
23	7,70	0	61	0,72	0	99	5,78	3,4
24	3,25	0	62	0,79	0	100	4,02	3,2
25	3,05	0	63	0,77	0	101	4,34	3,2
26	2,98	0	64	0,74	0	102	3,41	0
27	2,15	0	65	0,73	0	103	3,42	0
28	1,43	0	66	0,72	0	104	3,42	0
29	2,16	0	67	0,69	0	105	3,61	0
30	1,69	0	68	0,67	0	106	2,63	0
31	1,96	0	69	0,64	0	107	1,42	0
32	1,48	0	70	0,67	0	108	1,67	0
33	1,21	0	71	0,59	0	109	1,82	0
34	1,42	0	72	0,53	0	110	1,92	0
35	1,71	0	73	0,69	0	111	1,89	0
36	1,72	0	74	0,73	0	112	1,95	0
37	1,13	0	75	0,75	0	113	1,82	0
38	1,11	0	76	0,72	0	114	1,74	0

Dari data pada Tabel di atas terlihat bahwa fraksi protein 85-101 mempunyai aktivitas antibakteri, sedangkan fraksi protein 1 – 84 dan fraksi 102 – 114 tidak mempunyai aktivitas antibakteri.

Apabila hasil fraksinasi protein dengan kromatografi kolom DEAE digambarkan sebagai hubungan antara kandungan protein dan aktivitasnya, maka secara keseluruhan dapat dibuat grafik seperti yang dipaparkan pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* menggunakan kromatografi kolom DEAE, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm beserta aktivitasnya dengan difusi agar pada media nutrien.

Pada grafik di atas terlihat bahwa fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* pada kromatografi kolom DEAE menghasilkan tiga puncak kelompok protein. Namun hanya puncak kelompok protein ke III yang mempunyai aktivitas antibakteri. Total kandungan protein pada puncak III

apabila dikumpulkan dan diukur dengan metode Bradford didapat 20.640 μg protein.

5.4.2 Fraksinasi protein dari cacing tanah dengan kromatografi kolom sephadex G-100 (Filtrasi)

Fraksi aktif (puncak III) yang dihasilkan pada kolom kromatografi DEAE dikumpulkan, dilanjutkan pemisahannya dengan kromatografi kolom Sephadex G-100. Pengukuran kandungan protein fraksi kromatografi kolom Sephadex G-100 dengan spektrofotometer pada λ 280 nm dilakukan sampai dengan 71 fraksi, dihasilkan 2 puncak, yang kemudian diuji aktivitasnya. Puncak I (fraksi 3–8) tidak mempunyai aktivitas, sedang puncak II (fraksi 50–58) mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, data tersaji pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.7.

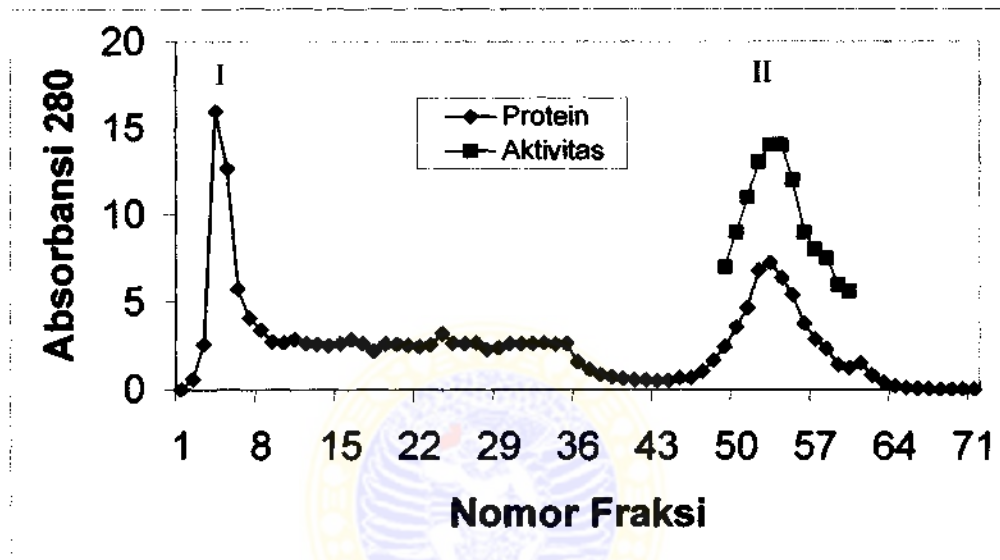


Tabel 5.4 Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom filtrasi dan pengukuran kandungan protein tiap fraksi dengan spektrofotometer pada λ 280 nm serta uji aktivitas dengan metode difusi agar

No. Fraksi	Abs 280 (nm)	Akti Vitas (ϕ mm)	No. Fraksi	Abs 280 (nm)	Akti Vitas (ϕ mm)
1	0,00	0	37	1,17	0
2	0,62	0	38	0,88	0
3	2,61	0	39	0,74	0
4	16,00	0	40	0,66	0
5	12,67	0	41	0,56	0
6	5,76	0	42	0,56	0
7	4,13	0	43	0,52	0
8	3,43	0	44	0,55	0
9	2,76	0	45	0,67	0
10	2,69	0	46	0,71	0
11	2,89	0	47	1,05	0
12	2,66	0	48	1,69	0
13	2,60	0	49	2,45	0
14	2,54	0	50	3,58	9,0
15	2,65	0	51	4,68	11,0
16	2,86	0	52	6,82	13,0
17	2,64	0	53	7,24	14,0
18	2,22	0	54	6,36	14,0
19	2,61	0	55	5,42	12,0
20	2,62	0	56	3,78	9,0
21	2,55	0	57	2,86	8,0
22	2,56	0	58	2,32	7,5
23	2,48	0	59	1,46	0
24	3,22	0	60	1,24	0
25	2,67	0	61	1,53	0
26	2,65	0	62	0,82	0
27	2,68	0	63	0,42	0
28	2,31	0	64	0,24	0
29	2,42	0	65	0,12	0
30	2,63	0	66	0,07	0
31	2,65	0	67	0,06	0
32	2,63	0	68	0,04	0
33	2,71	0	69	0,03	0
34	2,61	0	70	0,04	0
35	2,63	0	71	0,01	0
36	1,59	0			

Dari data pada Tabel di atas terlihat bahwa fraksi protein 51-58 mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, sedangkan fraksi protein 1 – 49 dan fraksi protein 59 – 71 tidak mempunyai aktivitas antibakteri

Apabila hasil fraksinasi protein dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 dan pengukuran kandungan protein serta aktivitasnya disajikan dalam bentuk grafik, maka didapatkan data seperti pada Gambar 5.7

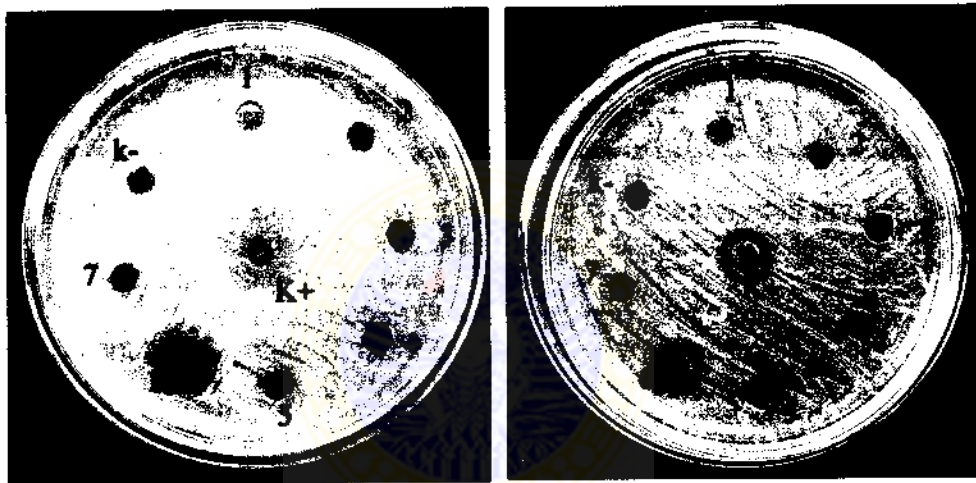


Gambar 5.7 Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* menggunakan kromatografi kolom Sephadex G-100, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm dan aktivitas diukur dengan difusi agar pada media nutrien.

Pada grafik di atas terlihat bahwa fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 menghasilkan dua puncak kelompok protein, Namun hanya puncak kelompok ke II yang mempunyai aktivitas antibakteri. Total kandungan protein pada puncak II apabila dikumpulkan dan di ukur dengan Bradford didapatkan 6,400 μ g protein.

5.5 Uji Aktivitas Protein Dari Cacing Tanah yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap tujuh macam pita protein menunjukkan bahwa potongan protein nomor 6 memberikan zona hambatan (jernih), yang berarti mempunyai aktivitas sebagai antibakteri., Sedangkan protein lainnya tidak memberikan zona hambatan, tersaji pada Gambar 5.9.



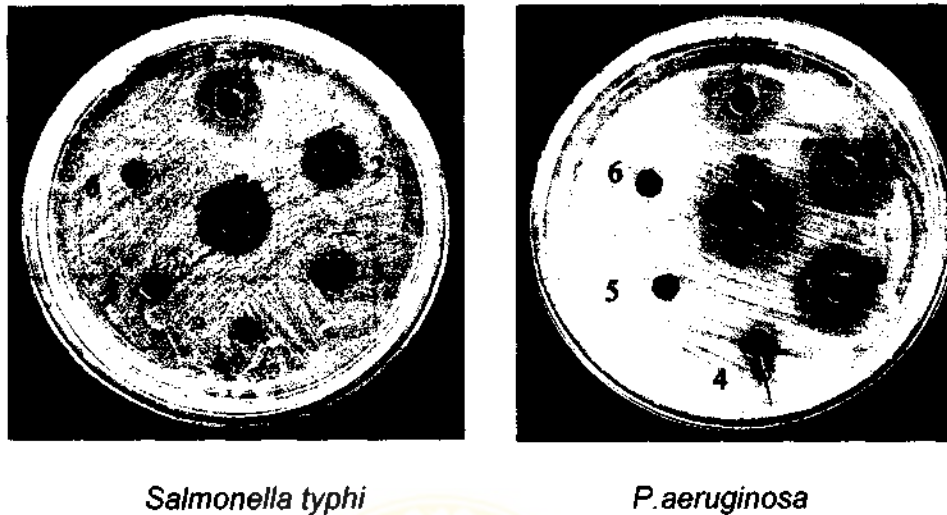
S. typhi

Sh. dysenteriae

Gambar 5.9 Uji aktivitas protein antibakteri hasil pemisahan Native-PAGE. pada media nutrisi. Sumur:1,2,3,4,5,6,7= no pita protein, tiap sumur 40 μ L konsentrasi 50 μ g protein. k-: bufer MOPS, k+: Kloramfenikol

Kuantitatif secara keseluruhan uji aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* hasil Native-PAGE dapat dilihat pada Tabel 5.5

masing sebesar 40 μ g/mL, 40 μ g/mL, 20 μ g/mL, 20 μ g/mL, 10 μ g/mL. Gambar 5.10 menunjukkan hasil penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum pada *S. typhi* dan *P.aeruginosa*, secara keseluruhan dapat dilihat pada tabel 5.6.



Gambar 5.10 Uji penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum protein antibakteri dari *Pheretima javanica* terhadap bakteri uji pada media agar nutrisi, dengan konsentrasi (1) 160; (2) 80; (3). 40; (4). 20; (5) 10 μ g/mL protein; (6) pelarut; (7a) 25 μ g/mL kloramfenikol; (7b) 25 μ g/mL gentamisin.

Pada kontrol antibiotik diameter zona hambatan nampak hampir sama dengan protein antibakteri, kecuali diameter zona hambatan pada *Salmonella typhi* no.3 dan *P.aeruginosa* no.4 nampak kecil.

Bila hasil uji Konsentrasi Hambatan Minimum dinyatakan menghambat (+) dan tidak menghambat (-), maka hasilnya disajikan pada Tabel 5.6

5.7.2 Analisis asam amino protein cacing tanah dengan *amino acid analyzer*

Untuk melihat karakter asam amino protein antibakteri, protein aktif dan protein yang tidak aktif dianalisis kandungan asam amino menggunakan *amino acid analyzer*.

Hasil analisis menunjukkan bahwa asam amino protein antibakteri (sampel no. 6) mempunyai karakter berbeda dengan asam amino protein lain yang tidak aktif (sampel no. 2, 4 dan 7). Protein antibakteri mengandung asam aspartat 4,15% dan hidrosiprolin 19,04% relatif tinggi, serta mengandung asam glutamat 3,90%, tirosin 3,73% dan lisin 1,13%, sedangkan protein lain yang tidak aktif tidak mempunyai asam glutamat, tirosin dan lisin (tabel 5.7).

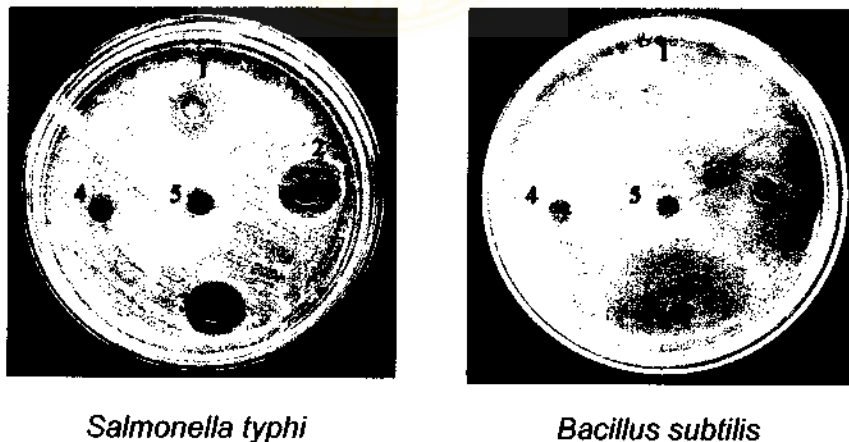
Tabel 5.7 Hasil analisis kandungan asam amino protein antibakteri dari *Pheretima javanica* dalam persen (%) Berat kering/Berat kering

No	Asam Amino	Sampel 2 Tidak aktif	Sampel 4 Tidak aktif	Sampel 6 Antibakteri	Sampel 7 Tidak aktif
	Berat Sampel	16,193 mg	16,193 mg	16,193 mg	16,193 mg
1.	Asam Aspartat	-	1,06%	4,15%	-
2.	Threonin	-	1,06%	1,63%	-
3.	Serin	1,08%	2,13%	2,59%	1,35%
4.	Asam glutamat	-	-	3,90%	-
5.	Glisin	-	-	-	-
6.	Alanin	20,65%	10,16%	5,29%	17,56%
7.	Sistein	-	-	-	-
8.	Valin	1,08%	1,06%	1,56%	1,35%
9.	Metionin	-	-	-	-
10.	Isoleusin	2,17%	2,67%	2,34%	2,70%
11.	Leusin	0,08%	1,60%	3,26%	-
12.	Tirosin	-	-	3,73%	-
13.	Fenilalanin	2,17%	2,60%	2,48%	1,35%
14.	Hidro lisin	-	0,53%	-	-
15.	Lisin	-	-	1,13%	-
16.	NH ₃	67,39%	56,68%	44,29%	74,32%
17.	Histidin	-	-	-	-
18.	Arginin	-	0,53%	1,74%	-
19.	Hidrosiprolin	-	11,90%	19,04%	-
20.	Prolin	4,34%	2,60%	2,80%	1,35%
	Jumlah	100%	100%	100%	100%

Tabel di atas jelas menunjukkan perbedaan karakter asam amino protein antibakteri (pita no 6) dengan protein lain yang tidak aktif. Besarnya kandungan hidroksiprolin (19,04%) mirip dengan kandungan prolin yang ditemukan pada *lumbricin* sebesar 15 % (Ju Hyun dkk, 1998). Diduga kandungan hidroksiprolin inilah yang berperan dalam aktivitas antibakteri protein no. 6.

5.7.3 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah

Protein antibakteri dari *Pheretima javanica* setelah dipanaskan pada suhu 25°C, 50°C dan 75°C selama 30 menit masih tetap aktif menghambat pertumbuhan bakteri uji, tetapi setelah dipanaskan di atas suhu 100°C dan 121°C sudah tidak menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hal ini dikarenakan protein sudah mengalami denaturasi, sehingga struktur aktifnya rusak. Gambar 5.12 hanya menampilkan pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri pada *Salmonella typhi* dan *Bacillus subtilis*, sedang secara keseluruhan disajikan pada Tabel 5.8 dan Gambar 5.13).



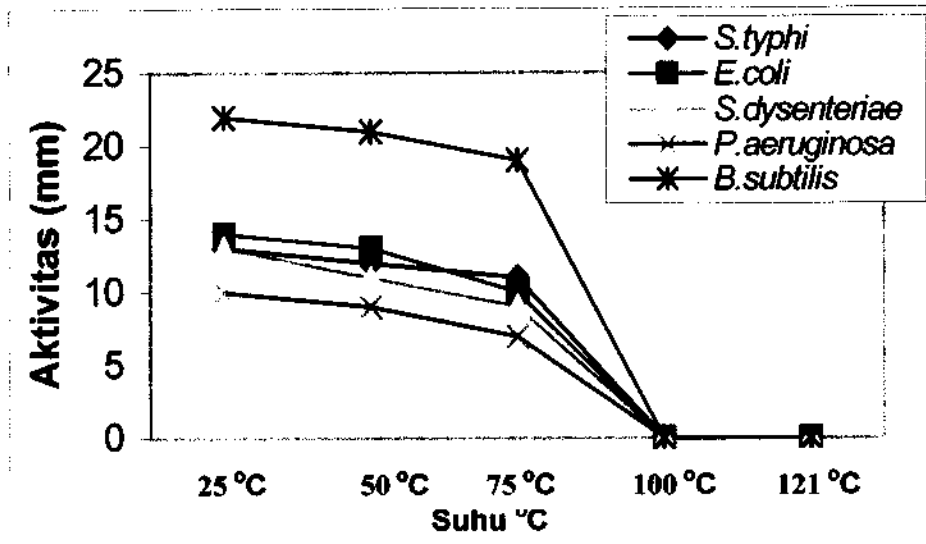
Gambar 5.12 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica*. 25°C (1), 50°C (2), 75°C (3), 100°C (4), 121°C (5), Inkubasi 30 menit, Tiap sumur berisi 50 µl dengan konsentrasi 50µg/mL pada media nutrisi.

Hasil pengamatan pengaruh suhu terhadap aktivitas antibakteri secara keseluruhan disajikan pada Tabel 5.8. Pada Tabel tersebut terlihat bahwa pada suhu yang sama zona hambatan terbesar dihasilkan pada *Bacillus subtilis*. Hal ini disebabkan karena *Bacillus subtilis* termasuk Gram positif yang mempunyai membran sel lebih sederhana dibanding membran Gram negatif.

Tabel 5.8 Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* terhadap lima macam bakteri uji

No	Mikro-Organisme	φ zona hambatan (mm) pada protein antibakteri setelah dipanaskan pada suhu				
		25°C	50°C	75°C	100°C	121°C
1.	<i>S. typhi</i>	13,0	12,5	11,0	-	-
2.	<i>E. coli</i>	14,0	13,0	10,0	-	-
3.	<i>S. dysenteriae</i>	13,5	11,0	9,0	-	-
4.	<i>P. aeruginosa</i>	11,5	9,5	7,5	-	-
5.	<i>B. subtilis</i>	22,0	21,0	19,0	-	-

Pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* optimum pada suhu 25 °C, jika dibuat grafik seperti Gambar 5.13.



Gambar 5.13 Grafik pengaruh suhu terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* terhadap lima macam bakteri uji

Pada Grafik di atas nampak bahwa sampai dengan suhu 75 °C, protein masih aktif dan hanya sedikit kecenderungan turun aktivitasnya, tetapi setelah dipanaskan di atas suhu 100°C dan 121°C sudah tidak menghambat pertumbuhan bakteri uji.

5.7.4 Pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari cacing tanah

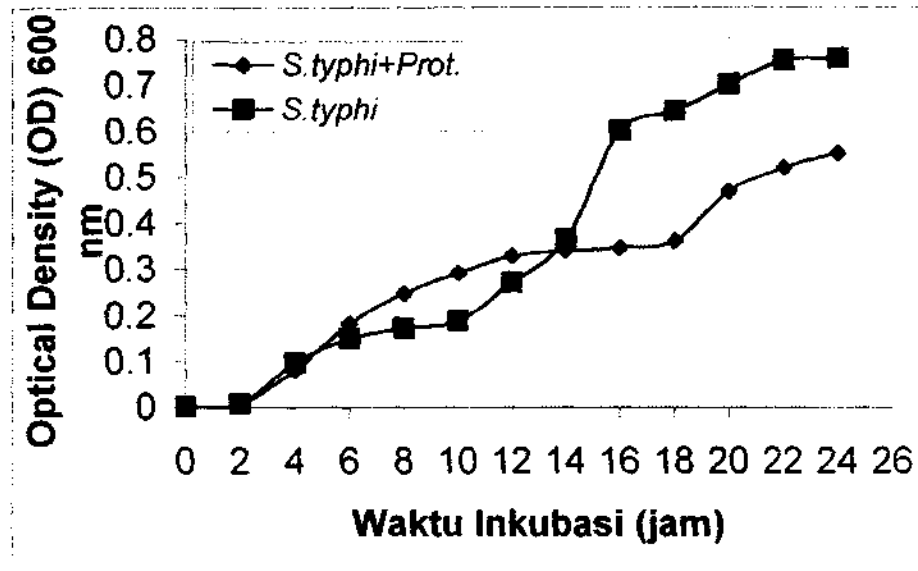
Data pengaruh pH terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* menunjukkan bahwa pada pH 4 – pH 9 protein masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji, dengan pH optimum 7. Rentangan pH ini masih sesuai dengan pH tubuh makhluk hidup pada umumnya dan larutan bufer dengan pH tersebut tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri.

5.7.5 Pertumbuhan bakteri uji dengan dan tanpa protein antibakteri

5.7.5.1 Pertumbuhan *S. typhi* dengan dan tanpa protein antibakteri

Bakteri ditumbuhkan dalam medium cair nutrisi dengan dan tanpa protein antibakteri, diinkubasi selama ± 24 jam pada suhu 37°C dan digojok, setiap 2 jam diamati kurva pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan *S. typhi* pada media tanpa protein antibakteri (garis merah pada Gambar 5.15) diketahui bahwa pada pengamatan jam ke 10-16 pertumbuhannya meningkat tajam. Sedangkan pada jam ke 16-22 pertumbuhan lambat, dan setelah jam ke 24 mencapai titik maksimum. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan *S. typhi* optimum pada 24 jam. Pada *S. typhi* yang diinkubasikan dengan protein antibakteri pertumbuhannya cenderung terus mendatar dan pada jam ke 18–20 pertumbuhannya meningkat, setelah 24 jam pertumbuhannya maksimum. Jika dianalisis dengan Uji T pada awal pertumbuhan jam ke 0 – jam ke 14 hasil Uji T (5,9) > 5, berarti tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan *S. typhi* dengan dan tanpa protein antibakteri. Tetapi pada pengamatan jam ke 14 – jam ke 24 hasil Uji T (0,1) < 5, berarti *S. typhi* yang diberi protein antibakteri pertumbuhannya lebih rendah secara signifikan dibanding pertumbuhan *S. typhi* tanpa protein antibakteri (lampiran 8 dan 9).

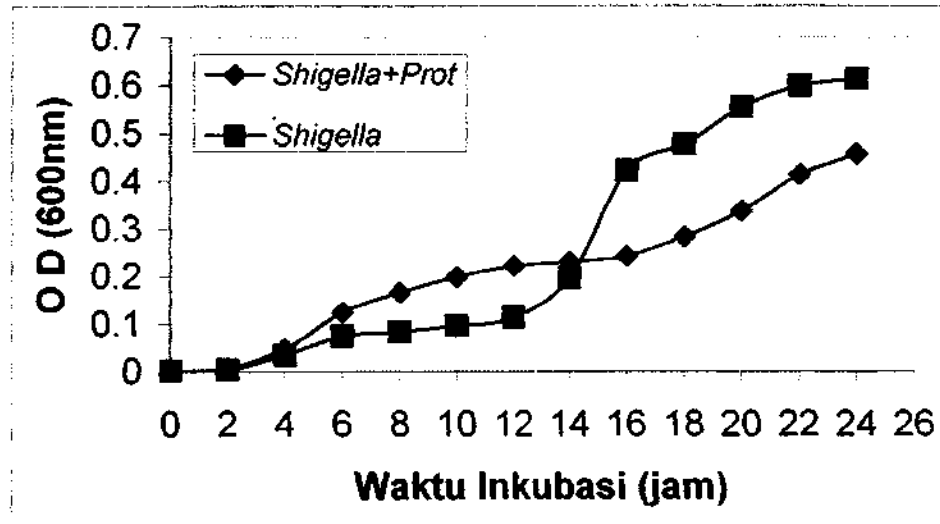


Gambar 5.15 Kurva pertumbuhan *S. typhi* pada media nutrisi cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.

5.7.5.2 Pertumbuhan *S. dysenteriae* dengan dan tanpa protein antibakteri

Hasil pengamatan pertumbuhan *S. dysenteriae* pada media nutrisi cair tanpa protein antibakteri (garis merah) tampak bahwa pada jam ke 12-16 pertumbuhannya meningkat pesat. Sedangkan pada jam ke 16-22 pertumbuhannya agak lambat, dan setelah jam ke 24 mencapai titik maksimum. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan *S. dysenteriae* optimum pada 24 jam. Tetapi pertumbuhan *S. dysenteriae* yang diinkubasi dengan protein antibakteri cenderung terus mendatar, baru setelah 16 jam ada peningkatan pertumbuhan dan setelah 24 jam pertumbuhannya optimum. Jika dianalisis dengan Uji T pada awal pertumbuhan jam ke 0 – jam ke 14 hasilnya $(1,2) < 5$, berarti ada perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan *S. dysenteriae* dengan dan tanpa protein antibakteri. Begitu juga pada pengamatan jam ke 14 – jam ke 24 hasil Uji T $(0,2) < 5$, berarti *S. dysenteriae* yang diberi protein antibakteri pertumbuhannya lebih

rendah secara signifikan dibanding pertumbuhan *S.dysenteriae* tanpa protein antibakteri (lampiran 8 dan 9).

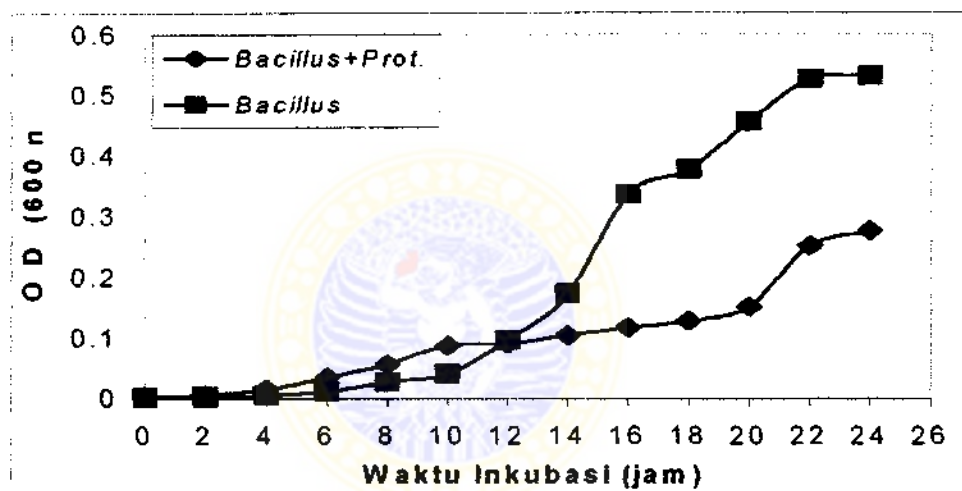


Gambar 5.16 Kurva pertumbuhan *S. dysenteriae* pada media nutrisi cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.

5.7.5.3 Pertumbuhan *E.coli* dengan dan tanpa protein antibakteri

Berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan *E.coli* pada media nutrisi cair tanpa protein antibakteri (garis merah Gambar 5.17) tampak bahwa pada jam ke 12-16 pertumbuhannya meningkat pesat, sedangkan pada jam ke 16-18 pertumbuhannya lambat dan jam ke 18-22 meningkat lagi pertumbuhannya, dan setelah jam ke 24 mencapai titik maksimum. Tetapi pertumbuhan *E.coli* pada media dengan protein antibakteri mulai jam ke 2-22 cenderung terus mendatar dan setelah 24 jam pertumbuhannya optimum. Apabila dianalisis dengan uji T pada awal pertumbuhan jam ke 0 – jam ke 14 hasilnya $(1,7) < 5$, berarti ada perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan *E.coli* dengan dan tanpa protein antibakteri. Begitu juga pada pengamatan jam ke 14 – jam ke 24 hasil Uji T $(0,2) < 5$, berarti *E.coli* yang diberi protein antibakteri

perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan *B.subtilis* dengan dan tanpa protein antibakteri. Pada pengamatan jam ke 14 – jam ke 24 hasil Uji T $(0,1) < 5$, berarti *B.subtilis* yang diberi protein antibakteri pertumbuhannya lebih rendah secara signifikan dibanding pertumbuhan *B.subtilis* tanpa protein antibakteri (lampiran 8 dan 9). Penghambatan pada pertumbuhan *B.subtilis* terbesar dibanding bakteri lain. Hal disebabkan *B.subtilis* merupakan bakteri Gram positif yang mempunyai membran sel lebih tipis dan sederhana dibanding Gram negatif.



Gambar 5.19 Kurva pertumbuhan *B.subtilis* pada media nutrisi cair dengan dan tanpa protein antibakteri selama 24 jam setiap 2 jam diamati pertumbuhannya dengan spektrofotometer pada λ 600 nm.

BAB. 6 PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi Cacing Tanah

Cacing tanah yang digunakan dalam penelitian ini diambil di daerah Jember, dan diidentifikasi di Laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember. Identifikasi dengan dua cara yaitu secara mikroskopis/anatomi dengan melihat ciri-ciri organ dalam tubuh. Cara makroskopis/morfologi dengan memperhatikan letak klitelum, warna tubuh, letak dan banyaknya seta serta segmen, bentuk mulut dan tubuh. Identifikasi dilakukan menggunakan buku acuan Gates, 1947 dan Lofty, 1974.

Hasil identifikasi didapatkan tiga jenis cacing tanah yaitu *Pheretima javanica*, *Postoscolex corethrurus*, *Pheretima capensis*. Budidaya dilakukan di laboratorium Biologi FKIP Universitas Jember. Hasil identifikasi ini kemudian dibandingkan dengan hasil identifikasi sebelumnya (Waluyo, 1993). Pearce, (2000) telah mengidentifikasi *Pheretima capensis* dan menunjukkan ciri-ciri yang sama dengan hasil penelitian yaitu mempunyai panjang 65-162 mm, jumlah segmen 85-140, bentuk gilik, berwarna merah keunguan di bagian permukaan atas, hidup ditempat yang banyak mengandung bahan organik. Demikian juga Poeloengan, (2001) mengidentifikasi *Pheretima javanica* yang hasilnya sama dengan hasil penelitian ini, yaitu mempunyai panjang 140-256 mm, bentuk bulat, jumlah segmen 102-127, warna bagian atas kehitaman dan *iridescent*, bagian bawah coklat muda sampai keputih-putihan, klitelum seperti cincin terletak pada segmen 14-16 berwarna keabu-abuan.

Secara umum ordo *Oligochaeta* dibagi menjadi enam famili; yaitu *Moniligastridae*, *Enchytraeidae*, *Octochaetidae*, *Glossoscolecidae*, *Lumbricidae* dan *Megascolecidae*. Di antara keenam famili tersebut yang paling banyak ditemukan adalah *Glossoscolecidae*, *Lumbricidae* dan *Megascolecidae*. Jenis-jenis yang paling banyak dibudidayakan berasal dari ketiga famili tersebut, antara lain *Lumbricus*, *Eisenia*, *Pheretima*, *Pontoscolex*, *Perionyx*, *Lidrilus* dan *Diplocardia* (Tim Penulis PS, 1992).

Di Indonesia belum diketahui secara pasti berapa jenis cacing tanah yang ada, Jenis cacing tanah yang kini banyak ditenakkan antara lain *Lumbricus*, *Pheretima*, *Pontoscolex* dan *Perionyx*. Keempat jenis cacing tanah ini menyukai bahan organik yang berasal dari pupuk kandang dan sisa-sisa tumbuhan.

6.2 Uji Aktivitas Ekstrak Cacing Tanah Dalam Berbagai Pelarut yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Pembuatan ekstrak protein dengan tiga macam pelarut yaitu: NaCl, bufer fosfat, bufer MOPS, menghasilkan sembilan macam ekstrak. Terhadap ke sembilan ekstrak protein tersebut dilakukan penapisan daya antibakterinya.

Hasil penapisan uji aktivitas daya antibakteri ke sembilan macam ekstrak membuktikan bahwa ekstrak *Pheretima javanica* dengan pelarut bufer MOPS, merupakan ekstrak cacing tanah yang menghasilkan daerah zona hambat terbesar, misalnya terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi* (10,0 mm) dibanding dengan ekstrak lainnya (daerah zona hambat \leq 8,0 mm) demikian juga terhadap bakteri uji lain (Tabel 5.2 no.3). Hal ini

didukung oleh hasil penelitian Poeloengan, (2001) yang membandingkan potensi daya antibakteri tiga jenis ekstrak cacing tanah yaitu *Pheretima javanica*, *Pheretima sp* dan *Pheretima acatina* terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi* yang menghasilkan zona hambat masing-masing 12,67 mm; 10,45 mm; 8,0 mm. Selain itu Waluyo (2003), menyatakan bahwa buffer MOPS paling tepat untuk digunakan sebagai pelarut protein cacing tanah.

Hal tersebut di atas dapat dijelaskan berdasar perbedaan sifat *P.javanica* dibandingkan jenis cacing tanah lain. *P. javanica* mempunyai sifat liar, lebih agresif, rakus dan kulitnya lebih kuat dibanding cacing tanah lainnya. Sifat-sifat di atas diduga dapat mempengaruhi kekebalan tubuh atau mempunyai daya antibakteri yang lebih kuat dibanding cacing tanah lainnya, sehingga *P. Javanica* lebih tahan terhadap pengaruh lingkungan dibanding dengan cacing tanah lain.

Dari tiga macam pelarut yang digunakan terpilih untuk melarutkan protein antibakteri *P. Javanica* adalah larutan bufer MOPS, karena protein antibakteri cacing tanah bersifat labil, sehingga memerlukan pelarut bufer yang tepat supaya dapat melarutkan protein secara maksimal dan mempertahankan stabilitasnya (Murray, 1994).

6.3 Fraksinasi Ekstrak Cacing Tanah dengan Kromatografi Kolom DEAE Sephacel (*Anion Exchanger*)

Fraksinasi ekstrak *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom *anion exchanger* menghasilkan 115 fraksi (tiap fraksi 2 mL). Tiap fraksi diukur kandungan proteinnya menggunakan spektrofotometer dan

dihasilkan 3 puncak protein. Puncak I (fraksi 5–17) dan puncak II (fraksi 19–23) merupakan fraksi yang diikat lemah oleh DEAE *anion exchanger* karena lebih banyak bermuatan negatif, maka keluar terlebih dahulu. Fraksi di daerah ke dua puncak tersebut cenderung bersifat protein anion. Puncak ke III (fraksi 85–101) merupakan fraksi yang terikat oleh gel DEAE *anion exchanger*. Protein tersebut keluar dari gel setelah diberi NaCl dengan gradien konsentrasi 0,380 M NaCl sebagai pengganti kation, Protein tersebut lebih bersifat kation. Setelah diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji, puncak I dan puncak II tidak menunjukkan zona hambatan atau aktivitas, sedang puncak III menunjukkan zona hambatan atau aktivitas (Gambar 5.6),

Carol, dkk (2000) berhasil mengisolasi protein antibakteri dari serangga yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* yang bersifat protein kation. Dilaporkan bahwa faktor-faktor penting yang menentukan aktivitas peptida-peptida antimikroba adalah posisi dan sifat dasar bermuatan positif yang dapat memberikan formasi struktur sekunder tertentu dan pembentukan lapisan hidrofobik pada molekul peptida (Falla, 1997).

6.4 Fraksinasi Protein Cacing Tanah dengan Kromatografi Kolom Sephadex G-100 (Filtrasi)

Fraksinasi dengan kromatografi kolom filtrasi menghasilkan 71 fraksi (tiap fraksi 2 mL), setelah setiap fraksi diukur dengan spektrofotometer dihasilkan 2 puncak. Puncak pertama diperoleh pada fraksi awal yaitu fraksi 3-8 dan puncak ke dua pada fraksi 50–58 (Gambar

5.7), puncak pertama merupakan fraksi yang keluar paling awal dari gel Sephadex G-100, mempunyai berat molekul antara 66,0 kDa–150,0 kDa, sedang puncak ke dua mempunyai berat molekul antara 7,0 kDa–55,0 kDa setelah diamati dengan SDS-PAGE. Pemisahan ini terjadi karena molekul protein yang besar tidak dapat masuk ke dalam pori-pori gel Sephadex G-100, sehingga molekul protein tersebut langsung turun dan keluar terlebih dahulu. Molekul protein yang kecil masuk terlebih dahulu ke pori-pori gel Sephadex G-100, sehingga memerlukan waktu yang lebih lama, oleh karena itu fraksi yang keluar mempunyai berat molekul rendah. Setelah diuji aktivitasnya, puncak kedua yang mengandung protein dengan Berat molekul rendah menunjukkan aktivitas menghambat pertumbuhan berbagai macam bakteri uji.

Hal ini didukung oleh beberapa peneliti pendahulu, bahwa protein antibakteri mempunyai berat molekul rendah (7 kDa–45 kDa). Ju Hyun dkk. (1998) telah berhasil mengisolasi antimikroba protein dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Vallier, dkk (1995) berhasil memisahkan protein antibakteri dari jenis *Eisenia fetida andrei* dengan filtrasi gel menjadi 11 puncak fraksi protein. Setelah diuji ternyata puncak 2 dan 3 menunjukkan aktivitas. Kelompok fraksi yang aktif dipisahkan lagi dengan *Chromatofocusing*, dihasilkan 5 puncak fraksi protein, dan setelah diuji aktivitasnya diperoleh 3 puncak fraksi yang aktif. Hasil karakterisasi dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa ketiga fraksi tersebut masing-masing mempunyai berat molekul 20,0 kDa, 40,0 kDa dan 45,0 kDa.

Purifikasi dengan kromatografi kolom Sephadex (Filtrasi) belum dapat menghasilkan protein yang murni, sehingga untuk menghasilkan protein yang murni harus dipurifikasi lagi, menggunakan Native-PAGE.

6.5 Pemurnian Protein Cacing Tanah dengan Cara Native-PAGE

Protein *Pheretima javanica* hasil kromatografi kolom Filtrasi pada puncak kedua yang mempunyai aktivitas dikumpulkan, kemudian dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%, disentrifugasi 8000 x g selama 15 menit dan dibersihkan amonium sulfatnya dengan Sephadex G-25. Selanjutnya protein dimasukkan ke dalam gel Native-PAGE. Dihasilkan pita-pita protein yang terdapat pada gel Native-PAGE, kemudian dipotong-potong didapatkan 7 pita protein, protein dikeluarkan dari gel Native-PAGE dengan elektroelusi. setelah protein keluar dari gel diuji aktivitasnya, pita protein no 6 menunjukkan aktivitas (Gambar 5.8 dan Gambar 5.9). Protein antibakteri ini dikarakterisasi berat molekulnya menggunakan SDS-PAGE.

Cara pemurnian dengan jalan pemotongan gel Native-PAGE ini mempunyai keuntungan, yaitu cepat dan presentasi kemurniannya tinggi, sedang kekurangannya adalah sulit untuk produksi dalam skala besar, tetapi kendala ini dapat diatasi dengan metode PAGE model tabung.

6.6 Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Protein Antibakteri Cacing Tanah Terhadap Bakteri Uji

Uji konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri terhadap bakteri uji pada Gram negatif : *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *E. coli*, *P. Aeruginosa* dan Gram positif: *B. subtilis*, masing-masing sebesar

40,0 μ g/mL, 40,0 μ g/mL, 20,0 μ g/mL, 20,0 μ g/mL, 10,0 μ g/mL protein antibakteri *Pheretima javanica*.

Hasil tersebut diperkuat oleh pendapat Ju Hyun dkk. (1998) yang menyatakan bahwa antimikroba protein yang diisolasi dari *Lumbricus rubellus* dapat menghambat bakteri Gram negatif: *E. Coli*, *P. putida*, *Serratia sp.*, Gram positif: *B. Subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans*, masing-masing pada konsentrasi: 12,0 μ g/mL, 16,0 μ g/mL, 16,0 μ g/mL, 12,0 μ g/mL, 16,0 μ g/mL, 30,0 μ g/mL.

6.7 Karakterisasi Berat Molekul Protein Antibakteri dari Cacing Tanah dengan SDS-PAGE

Berat molekul protein antibakteri pada pita ke 6 dikarakterisasi dengan SDS-PAGE, menghasilkan dua berat molekul yaitu 31,0 kDa dan 34,0 kDa (Gambar 5.11). Kedua protein tersebut dapat berupa dua monomer yang berasal dari satu globular protein atau protein lain (ikutan) belum dapat dipastikan. Untuk memastikan keduanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan teknik *2-Dimensional Gel Electrophoresis*.

Karakter protein antibakteri *P. Javanica* berbeda dengan temuan Milochau, dkk (1997) yang telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi cairan *coelomic* cacing tanah *Eisenia fetida andrei*, yang mempunyai aktivitas antibakteri dan diberi nama *fetidin* dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0 kDa. Begitu juga Vaillier dkk, (1995) yang telah mengisolasi dan mengkarakterisasi cairan *coelomic* cacing tanah *Eisenia fetida andrei*, mempunyai berat molekul 20,0 kDa, 40,0 kDa dan 45,0 kDa. Ju Hyun dkk. (1998) telah berhasil mengisolasi antimikroba protein cacing

tanah *Lumbricus rubellus* dan hasil karakterisasinya menunjukkan bahwa isolat protein yang diberi nama *lumbricin I* mempunyai berat molekul 7,231 kDa.

Protein antibakteri pada setiap jenis cacing tanah mempunyai berat molekul yang berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan karena habitat yang berbeda, makanan yang berbeda dan iklim yang berbeda, sehingga menghasilkan protein antibakteri yang berbeda.karakternya.

6.8 Analisis Kandungan Asam Amino Protein Cacing Tanah Dengan *Amino Acid Analyzer*

Sampel protein aktif dan tiga sampel protein tak aktif dianalisis kandungan asam amino dengan *amino acid analyzer*. Hasil analisis sampel menunjukkan bahwa protein antibakteri mempunyai karakter yang berbeda dengan sampel lain yang tidak aktif. Protein antibakteri mengandung asam glutamat 3,90% dan tirosin 3,73%, sedang pada sampel lain tidak ditemukan kedua asam amino tersebut, demikian juga kandungan hidroksiprolin 19,04% dan asam aspartat 4,15% yang pada sampel lain relatif kecil (Tabel 5.7).

Hal ini didukung pendapat JuHyun dkk (1998) yang telah berhasil mengkarakterisasi protein antibakteri dari *Lumbricus rubellus* yang mengandung prolin 15,0% dan 76 asam amino. Protein antimikroba sebagai salah satu alat pertahanan diri terhadap infeksi mikroba paling universal pada organisme hidup [Gabay, 1994], telah ditemukan baik pada vertebrata maupun invertebrata.

Purifikasi dan karakterisasi protein *P. javanica* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap berbagai jenis bakteri. Salah satu sifat protein antibakteri *P. javanica* adalah tingginya kandungan hidroksiprolin (19,04%), walaupun kandungan prolinnya relatif rendah. Hidroksiprolin adalah produk hidroksilasi prolin dalam tubuh. Tingginya kandungan prolin merupakan pengaruh penting pada pembentukan struktur sekunder protein antibakteri. Tingginya prolin merupakan karakter khusus yang dimiliki protein antimikroba. Banyak protein antimikroba kaya prolin ditemukan dari sumber-sumber lain misalnya *apidaecin*, *drososin*, *metchnikowin*, *bacteneccin* dan *PR-39* (Agerbert, dkk, 1991). Antimikroba di atas memiliki karakter umum yang diakibatkan oleh tingginya prolin, dan bermuatan asam amino positif, tetapi spektra antimikroba dan mekanisme kerjanya berbeda satu sama lain. *Apidaecin*, *bacteneccin* dan *PR-39* hanya membunuh bakteri Gram negatif. *Drosocin* membunuh kedua bakteri Gram positif dan Gram negatif, tetapi tidak berdaya melawan fungi. *Metchnikowin* antibakteri melawan bakteri Gram positif dan fungi, tetapi tidak melawan bakteri Gram negatif. Untuk *apidaecin*, aktivitas antibakterinya dilakukan melalui mekanisme pembentukan non-pori yang melibatkan *stereospecificity* [Casteels, 1994]. *Bacteneccin* menambah permeabilitas membrannya, menyebabkan berkurangnya metabolit seluler, dan *PR-39* dikenal mampu menangkap protein dan sintesa DNA dalam sel [Boman,1993]. Bagaimana cara kerja protein antibakteri *P.javanica* yang sebenarnya, saat ini belum diketahui. Bagaimanapun luasnya ruang lingkup kegiatan menunjukkan bahwa

mekanisme kerjanya berbeda dari anggota keluarga protein kaya prolin yang lain. Protein antibakteri *P.javanica* cenderung bermuatan positif, tampaknya jika muatan positif itu sendiri tidak diperhitungkan bagi aktivitas antibakteri, maka begitu pula faktor struktural lainnya, seperti struktur sekunder, yang dapat berperan sama pentingnya dengan muatan positif. Dilaporkan bahwa faktor-faktor terpenting dalam aktivitas protein-protein antimikroba termasuk posisi dan sifat dasar residu bermuatan positif, formasi struktur sekunder tertentu, dan pembentukan lapisan hidrofobik pada molekul (Falla, 1997).

6.9 Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah

Hasil uji aktivitas protein antibakteri setelah dipanaskan pada berbagai suhu menunjukkan bahwa, protein antibakteri masih tetap menghambat pertumbuhan bakteri baik Gram negatif maupun Gram positif pada suhu 25°C sampai 75°C. Sedang pada suhu 100 °C sampai 121°C sudah tidak aktif lagi. Gejala ini menunjukkan bahwa setelah dipanaskan pada suhu 100°C keatas protein mengalami denaturasi, (Gambar 5.12), sehingga protein antibakteri *Pheretima javanica* dapat dikatakan protein yang tahan terhadap panas, maka akan mempermudah purifikasi dan penanganan atau penerapan lebih lanjut.

Hasil ini didukung oleh pendapat Sumardi (1999) yang menyatakan bahwa ekstrak *Allolobophora rosea* yang telah dipanaskan 50°C dan 75°C, selama 60 menit masih tetap aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan setelah dipanaskan pada suhu 100°C dan

121°C tidak aktif lagi. Hal ini disebabkan karena protein setelah dipanaskan diatas 75°C sudah mengalami denaturasi yang menyebabkan kerusakan struktur, yang berperan aktif salah satunya sebagai antibakteri.

6.10 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah

Aktivitas protein antibakteri sangat dipengaruhi oleh pH, sehingga penting diketahui pH optimumnya. Protein antibakteri *Pheretima javanica* mempunyai pH optimum 7,0 yang mempunyai aktivitas daya hambat pertumbuhan bakteri paling tinggi yaitu mempunyai zona hambat 15,4 mm, pada pH 6,0 mempunyai aktivitas 14,0 mm, sedang pada pH 8,0 mempunyai aktivitas 12,0 mm. Pada pH > 8,0 dan pH < 6,0 aktivitasnya sangat rendah yaitu 8,0-9,0 mm (Tabel 5.9 dan Gambar 5.14). Hal ini sesuai dengan keadaan pH pada saluran pencernaan mamalia yaitu antara 6,0-7,0, sehingga apabila diterapkan sebagai obat sangat sesuai dan lebih mudah penanganannya.

6.11 Pengaruh Protein Antibakteri Dari Cacing Tanah Terhadap Pertumbuhan Bakteri Uji

Pada Gambar 5.15; 5.16; 5.17; 5.18; 5.19, pertumbuhan bakteri uji pada media cair nutrien broth dengan dan tanpa protein antibakteri pada pengamatan 0 jam sampai dengan jam ke 14 setelah dilakukan Uji T pada umumnya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Tetapi pada pengamatan jam ke 14 - jam ke 24 pada semua bakteri uji yang diberi protein antibakteri dari cacing tanah pertumbuhannya terhambat secara signifikan dibanding pertumbuhan

bakteri tanpa protein antibakteri (lampiran 9). Kejadian ini sangat menarik untuk diteliti lebih lanjut, mengapa protein antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri uji setelah diinkubasi pada jam ke 14. Data ini menunjukkan bahwa protein antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri uji yang bersifat bakteristatik. Sifat kerja protein antibakteri *Pheretima javanica* ini sama dengan hasil penelitian Vaillier dkk, 1995. Beliau melakukan penelitian sifat kerja protein antibakteri dari cairan coelomic *Eisenia fetida andrei* yang juga bersifat bakteristatik. Pertumbuhan bakteri uji ini setelah 24 jam mulai mendatar, ini berarti pertumbuhan bakteri mencapai maksimum pada kurun waktu 24 jam.

Daya hambat protein antibakteri terhadap *B. subtilis* lebih besar dibanding terhadap bakteri Gram negatif, karena dinding sel *B. subtilis* lebih sederhana dan lebih tipis dibanding bakteri Gram negatif.

Uji pertumbuhan bakteri dengan cara absorbansi (optical density) ini mempunyai keuntungan dan kelemahan, keuntungannya lebih efisien, praktis dan cepat, kelemahannya karena berdasarkan absorbansi maka bakteri yang hidup dan yang mati ikut terhitung, sehingga kurang representatif untuk menunjukkan jumlah bakteri yang hidup dengan sesungguhnya dan harus dapat mengkonversi antara besarnya OD dengan jumlah sel. Cara yang lebih tepat yaitu dengan plating kemudian dihitung jumlah koloni selnya, tetapi cara plating ini memerlukan biaya yang lebih banyak, pekerjaannya lebih banyak dan memerlukan waktu yang lebih lama.

Dari uraian keseluruhan penelitian ini dapat dirangkum bahwa protein antibakteri *Pheretima javanica* yang mempunyai karakter berat molekul 31,0 kDa dan 34,0 kDa, mengandung hidropsiprolin 19,04%, bersifat kation dan termostabil, pH netral serta aktif dalam konsentrasi rendah. Diharapkan ke depan dapat dibuat rekombinant protein, yang dimulai dari isolasi DNA sampai dapat dimasukkan ke dalam tubuh bakteri *Escherichia coli*, sehingga dapat dioperasikan untuk mensintesa protein (recombinant protein) antibakteri. Lebih jauh dapat diterapkan untuk pengembangan obat alternatif penyakit tipus dan penyakit infeksi bakteri patogen pada umumnya.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Cacing tanah *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrurus* mengandung protein antibakteri,
2. Ekstrak *Pheretima javanica*, *Pheretima capensis* dan *Pontoscolex corethrurus* dalam pelarut MOPS menghasilkan diameter zona hambatan terhadap bakteri uji masing-masing sebesar antara 10,0-14,0 mm, 6,0-9,0 mm dan 7,0-10,0 mm.
3. Purifikasi protein antibakteri *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom DEAE dan Sephadex G-100, yang dilanjutkan dengan Native-PAGE menghasilkan satu pita protein.
4. Penentuan konsentrasi hambatan minimum protein antibakteri *Pheretima javanica* terhadap bakteri Gram negatif : *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, Gram positif: *B. subtilis* masing-masing sebesar: 40,0; 40,0; 20,0; 20,0; 10,0 μ g/mL protein.
5. Protein antibakteri *Pheretima javanica* mempunyai karakter berat molekul 31,0 kDa dan 34,0 kDa, mengandung hidroksiprolin 19,04 %, memiliki daya antibakteri pada suhu 25 - 75⁰C, optimum pada pH 7 dan mempunyai sifat kerja bakteriostatik.

7.2 Saran

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan sebagai acuan untuk produksi obat alternatif penyakit tipus dan infeksi bakteri lainnya. Untuk penggandaan protein dapat dilakukan dengan metode kloning, dengan cara protein antibakteri *P. javanica* ditentukan urutan asam aminonya, diteruskan kloning gen protein antibakteri, dan DNA yang didapat ditranspormasikan ke sel bakteri untuk menghasilkan protein antibakteri dalam jumlah besar.



DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, 1996. Pengaruh penggunaan media sampah rumah tangga dengan berbagai tingkat umur pengomposan dan waktu pemeliharaan terhadap biota cacing tanah jenis *Lumbricus rubelus*, Tesis, Jurusan Biologi, FMIPA, UNPAD, Bandung, pp14-17.
- Agerbert B, Lee J.Y, Bergmann T, 1991. Amino acid squense of Pr-39, Eur, *J.Biochim.* 202: 849-854.
- Albro P.W, Schroeder J.L, Corbett J.T, 1992. Lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Pubmed* 27(2): 136-43.
- Aniek S.B, 1992. Instruction Manual of Model 835 High Speed Amino Acid Analyzer Modification, pp 1-2.
- AOAC International, 1992. Bacteriological Analytical Manual. Arlington, pp 327-342.
- Baguinon N.T, 1978. Taxonomic and ecological survey of earthworms at Mt. Gede-Pangrango complex, West Java, Biotrop. Bogor, Indonesia. *Report*, pp 30-32. ,
- Boman H.G, 1993. Mechanism of action on *Eescherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, *Immun.* 61: 2978-2984.
- Bouche M.B, 1972. Lombriciens de France. **Ecologie et Systematique**. I.N.R.A. Paris, pp 37-41.
- Carol L. Friedrich, Dianne Moyles, Terry J. Beveridge, Robert E. W. Hancock, 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 44(8): 2086.
- Casteels P, 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreformin mechanism involving stereospecificity, **Biochem**, 199: 339-345.
- Cociancich S, Bulle P, Hetru C, 1994. The inducible antimicrobial peptides of insects, **Parasitol. Today** 10 : 132-139.
- Dash M.C. dan Senopati B.K, 1982. Enviromental regulation of Oligochaeta reproduction in tropical pasture. **Pedobiologia**. 123 : 270-271.
- Doerge RF. Ed. 1982. Wilson and Gisvol's texbook of organic and Pharmaceutical Chemistry. **Philadelphia, Toronto: J.B. Lippincott Company** 32: 78-81.

- Edwards C.A. dan Lofty J.R, 1972. **Biology of earthworms** Chapman and Hall LTD. London, pp 158-162.
- Evans A.C. dan Guild W.J. Mcl, 1968. Studies on the relationship between earthworms and soil fertility. IV. On the life cycles of some British Lumbricidae. **Ann. appl. Biol.** 35 : 471-484.
- Falla T.J, 1997. Improved activity of a synthetic indolicidin analog, **Antimicrob.** 41: 771-775.
- Gabay J.E, 1994. Ubiquitous natural antibiotics, **Science** 264: 373-374.
- Gates G.E, 1947. On some earthworms from the buitenzorg museum 3. III. **Treubia.** 19: 139-166.
- Gerard B.M, 1980. The biology of certain British earthworms in relation to environmental conditions. **Ph.D. Thesis.** London, pp 35-38.
- Grant W.C, 1985. Temperature relationships in the Megascolecid earthworm *Pheretima hupeiensis*. **Ecology.** 36 (3): 412-417.
- Hancock R.R.W, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics, **Trends Biotechnol.** 16: 82-87.
- Handreck dan Arthur K, 1988. Earthworms for gardeners and fishermen. **National library of Australia**, pp 23-26.
- Hogben L. dan Kirk R.L, 1974. Body temperature of worms in moist and dry air. **Pro. Roy. Soc. Lond.** 132 :239-252.
- Jawetz J.L Melnick dan E.A Adelberg, 1995. Mikrobiologi untuk profesi kesehatan. **EGC Penerbit Buku Kedokteran**, Jakarta, pp 43-51.
- Ju Hyun Cho, Chan Bae Park, Young Geol Yoon, Sun Chang Kim. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. **Biochimica et Biophysica Acta.** South Corea. pp 67-76.
- Karsten GR dan Drake HL, 2002. Isolation and characterization enzim of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Pubmed** 76: 146-54.
- Kelly K.J, 1996. Using host defenses to fight infectious diseases, **Nature Biotechnol.** 14: 587-590.
- Kubiena W.L, 1983. **Bestimmungsbuch und Systematik der Boden Europas.** Stuttgart, pp 392.

- Lee K.E, 1989. The earthworm fauna of New Zealand. *Bull. N. Z. Dep. Scient ind. Res.* 130 : 481-486.
- Lofty J.A, 1972. Oligochaetes. In : **Biology of Plant Litter and Decomposition.** 2 ed. by Dickinson, C.H. and Punch, G.J.F. Acad. Press London. New York, pp 191-213.
- Michon J, 1979. Influence of desiccation diapause in Lumbricids. *C.r. hebdomadaire Seances Acad Sci. Paris.* 228 (18): 1455 - 1456.
- Milochau A, Lassegues M, Valembos P, 1997. Purifikasi, characterization and activities of two hemolytic and antibacterial proteins from coelomic fluid of the annelid *Eisenia fetida andrei*. *Biochim Biophys Acta* Jan 4; 1337: 12332.
- Michael R. Yeaman and Nannette Y. Yount, 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, pp 26-31.
- Moore B, 1972. Earthworms and soil reaction. *Ecology.* 3: 347-348.
- Muliasari I, 1996. Kontaminasi bakteri Gram negatif pada makanan yang dijual di sekitar kampus pusat Unpad serta uji sensitifitasnya terhadap obat tradisional cacing tanah secara in vitro. *Penelitian, FMIPA, Unpad, Bandung,* pp 43-47.
- Murray P. Deutscher, 1994. Guide to protein purification. New York, pp 89-97.
- Nicolas P., Mor A, 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates, *Annu Rev. Microbiol.* 49: 277-304.
- Olson, J.N., 1968. The earthworms of Ohio. *Ohio Biol. Surv. Bull.* 17: 47-90.
- Phillips E.F, 1973. Earthworms, plants and soil reactions. *Ecology,* 4: 89.
- Pearce T.G, 2000. The calcium relations of selected lumbricidae. *J. Anim Ecol.* 41 : 167-188.
- Poeloengan M, Sudarno dan Praptiwi, 2001. Pengujian ekstrak cacing tanah (*Pheretima* sp) terhadap pertumbuhan *Salmonella* sp *Penelitian,* pp 43-48.
- Ratningsih N. dan Rustama M, 1998. Peranan berbagai jenis cacing tanah terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri Gram positif penyebab diare. *F.MIPA Universitas Pajajaran, Bandung,* pp 56.

- Raw F, 1962. Earthworm population studies : a comparison of sampling methods. **Nature**, London, pp 184-187.
- Reinecke A.J, 1974. The upper lethal temperature of *Eisenia rosea* (Oligochaeta). *Wetenskaplike Bydraes van die P.U. vir C.H.O. Reeks B : Nature*, 62 : 1-14.
- Roots B.I, 1986. The water relations of earthworms. II. Resistance to desiccation and immersion and behaviour when submerged and when allowed choice of environment. *J. exp. Biol.* 33: 29-44.
- Rositawati, 1999. Uji ekstrak cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai anti bakteri . **Penelitian**, pp 21-24.
- Satchell, J.E. 1987. Some aspects of earthworm ecology. In: **Soil Zoology**, Ed.D.K. Kevan. Butterworths, London and New York. pp. 180-201.
- Sergienko M.I, 1969. The distribution of earthworms in the biocoenoses of chernogora at the ecological profile Vorochta-Goverla. **Pedobiologia**. 9 : 112-113.
- Sim R.W. dan Easton E.C, 1972. numerical revision of the earthworms genus *Pheretima* auct (*Megascolecidae* : *Oligochaeta*) with the recognition of new genera and the earthworms collected by the Royal Society North Borneo. **Biol. J. Linn. Soc.** 4(3): 169-269).
- Simanjuntak A.K. dan Waluyo J. 1982. Cacing tanah budidaya dan pemanfaatannya. P.T. Penebar Swadaya, pp 35-39.
- Siswandono dan Soekardjo B. 1998. Prinsip-Prinsip Rancangan Obat. **Airlangga University Press**. Surabaya, pp 64-69.
- Stryer L, 2000. **Biochemistry**, Stanford University, pp 136-139.
- Sugiarto, 1998. Pemanfaatan cacing tanah untuk pengobatan, pp 32-36.
- Sumardi, 1999. Deteksi dan karakterisasi senyawa antibakteri ekstrak cacing tanah *Allolobophora rosea*. **J. Bioteknologi**. 63-68.
- Tim Penulis PS, 1992. Cacing Tanah. Aneka cara budidaya, penanganan lepas panen, peluang campuran rangsum ternak dan ikan. Jakarta, pp 54-57.
- Vaillier J, Cadoret MA, Roch P, Valembois P, 1995. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. III. Isolation and characterization of several bacteriostatic molecules from *Eisenia fetida andrei*, pp 79-82.









