

PENGARUH PROTEIN TELUR DAN ZAT BESI TERHADAP AKTIVITAS ANTI-BAKTERI OKSITETRASIKLIN YANG DIPANASKAN

The Effect of Egg Protein and Iron on Antibacterial Activity of Heated Oxytetracycline

A. Hintono¹, M. Astuti², H. Wuryastuti³, Endang S. Rahayu²

ABSTRAK

Protein telur (ovalbumin, konalbumin dan fosvitin) dan zat besi ditambahkan pada larutan oksitetrasiklin yang kemudian dipanaskan pada suhu 70°C dan 80°C selama 20 menit. Setelah pemanasan, aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin diuji. Hasil menunjukkan bahwa protein telur dapat mempertahankan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan 70°C selama 20 menit dan menghambat penurunan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan 80°C selama 20 menit, sedangkan zat besi dapat menghilangkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan. Konalbumin dan fosvitin dapat mengurangi kemampuan zat besi dalam menghilangkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin, namun demikian zat besi secara nyata menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan bersama-sama protein telur ($p < 0,05$).

Kata kunci: oksitetrasiklin, protein telur, zat besi, pemanasan, aktivitas anti-bakteri

ABSTRACT

Egg protein (ovalbumin, conalbumin and phosvitin) and iron were added to oxytetracycline solution heated at 70°C and 80°C for 20 minutes. After heating, the antibacterial activities of oxytetracycline were evaluated. The results indicated that egg proteins maintained antibacterial activity of heated oxytetracycline at 70°C for 20 minutes and retarded on the decrease of antibacterial activity of heated oxytetracycline at 80°C for 20 minutes, where as iron contributed on the loss of antibacterial activity of the heated oxytetracycline. Conalbumin and phosvitin reduced the ability of iron to lose the antibacterial activity of oxytetracycline, however iron decreased antibacterial activity of oxytetracycline heated with the egg protein significantly ($p < 0.05$).

Key words: oxytetracycline, egg protein, iron, heating, antibacterial activity

PENDAHULUAN

Oksitetrasiklin (OTC) merupakan salah satu antibiotik yang banyak digunakan di peternakan ayam, baik untuk tujuan pengobatan, pencegahan penyakit, pemacu pertumbuhan, efisiensi pakan, maupun pemacu produksi telur. Namun penggunaan oksitetrasiklin pada ayam petelur dengan berbagai cara dan dosis pemberian berpotensi menimbulkan residu dalam telur (Meredith dkk., 1965; Yoshimura dkk., 1991; Markakis, 1992; Omija dkk., 1994; Nagy dkk., 1997;

Donoghue dan Hairston, 1999; Ruyck dkk., 1999). Bahaya residu antibiotik dalam bahan pangan di samping dapat bersifat toksik langsung dan menyebabkan alergi, juga yang lebih berbahaya dapat menyebabkan seleksi bakteri patogen yang resisten antibiotik (Katz dan Brady, 1993; Meng dkk., 1998). Residu antibiotik akan menyebabkan resistensi bakteri kalau masih menunjukkan sifat anti-bakterinya; oleh karenanya aktivitas anti-bakteri dari residu antibiotik perlu mendapat

¹ Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Kampus Tembalang, Jalan Prof. Sudharto, SH, Tembalang, Semarang.

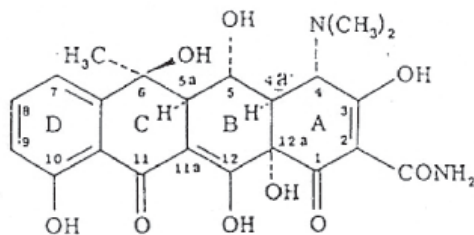
² Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Yogyakarta 55281.

³ Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Sekip Unit II, Yogyakarta 55281.

perhatian dalam menentukan potensi bahaya residu antibiotik dalam bahan pangan.

Oksitetrasiklin dalam air tidak stabil terhadap panas (Rose dkk., 1996), namun oksitetrasiklin dalam telur lebih tahan terhadap panas; dengan metoda pemasakan biasa, seperti penggorengan dan perebusan, tidak dapat menginaktifkan residu oksitetrasiklin dalam telur (Meredith dkk., 1965; Yonova dalam Moats, 1988).

Struktur kimia oksitetrasiklin dengan sejumlah gugus fungsional yang dimiliki (Gambar 1.) memungkinkan terbentuknya kompleks khelat dengan ion-ion logam divalen atau polivalen (Higuchi dan Bolton, 1959; Cook dkk., 1993).



Gambar 1. Oksitetrasiklin

Kompleks oksitetrasiklin-logam relatif stabil dibanding oksitetrasiklin bebas (Connors dkk., 1986), hal ini merupakan salah satu faktor yang diduga mempengaruhi stabilitas residu oksitetrasiklin terhadap panas (Fedeniuk dkk., 1997); namun demikian penambahan zat besi (Fe) pada oksitetrasiklin dapat menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin, bahkan dengan disertai pemanasan dapat menginaktifkannya. Pemanasan larutan oksitetrasiklin 100 ppm yang ditambah larutan 0,001 M FeCl₂ pada suhu 70°C selama 20 menit dan 80°C selama 15 menit dapat menghilangkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin (Hintono dkk., 2003).

Walaupun telur mengandung zat besi, baik pada kuning maupun putih telur (Powrie dan Nakai, 1990); tetapi residu oksitetrasiklin dalam telur masih menunjukkan aktivitas anti-bakteri walaupun dipanaskan. Hal ini diduga karena telur kaya akan protein, yakni albumin yang dapat membentuk kompleks dengan oksitetrasiklin (Ali, 1984) sehingga memungkinkan terjadinya kompetisi dengan zat besi, sedangkan protein yang lain yakni konalbumin dan fosvitin dapat mengikat logam divalen termasuk zat besi (Osuga dan Feeney, 1977) sehingga memungkinkan terjadinya kompetisi dengan oksitetrasiklin dalam hal pengikatan zat besi.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin bila dipanaskan bersamaan dengan protein telur dan zat besi. Penelitian ini merupakan penelitian awal yang dilakukan dalam rangka untuk mengungkap ketahanan residu oksitetrasiklin dalam telur yang telah mengalami pemasakan dan mengkaji kemungkinan penggunaan zat besi untuk menginaktifkan residu oksitetrasiklin dalam telur.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Sebagai bahan percobaan digunakan Oksitetrasiklin-HCl (Huashu-Dafeng Pharm., China), protein telur : Ovalbumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), Konalbumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) dan Fosvitin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), FeCl₂.4H₂O (Merck, Darnstadt, Germany) sebagai sumber zat besi, “deionized water”, “Nutrient Broth” (Oxoid), “Nutrient Agar” (Oxoid).

Peralatan

Tabung reaksi dengan tutup berulir, vorteks, penangas air (MGW Lauda MT/2), termokopel (HI92704C Hanna Instruments, Portugal), cawan petri, otoklaf (Hiclave HVE 25, Hirayama), inkubator (Environmental Chamber, Forma Scientific), jangka sorong.

Percobaan

Larutan Oksitetrasiklin-HCl 100 ppm dimasukkan ke dalam 4 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml, ke dalamnya ditambahkan masing-masing 2 ml H₂O, 2 ml 0,02 mM ovalbumin, 2 ml 0,02 mM konalbumin, dan 2 ml 0,02 mM fosvitin, ditutup dan dihomogenkan dengan vorteks. Campuran tersebut diuji aktivitas anti-bakterinya baik sebelum dipanaskan maupun setelah dipanaskan. Pemanasan dilakukan dalam penangas air pada suhu 70°C dan 80°C masing-masing selama 20 menit, dan segera didinginkan dengan air es setelah pemanasan selesai. Secara bersamaan juga dikerjakan percobaan yang sama namun penambahan protein pada larutan oksitetrasiklin-HCl dibarengi dengan penambahan 2 ml larutan 0.001 M FeCl₂.

Uji aktivitas anti-bakteri.

Semua larutan sampel oksitetrasiklin yang telah mendapat perlakuan dan akan diuji aktivitas anti-bakterinya disaring dengan menggunakan “syringe filter” (Milipore 0.22mm).

Pengujian aktivitas anti-bakteri dilakukan dengan metoda difusi agar (Madigan dkk, 1997) dengan menggunakan bakteri uji *Bacillus cereus* FNCC0057 yang diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC) Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.

Kultur bakteri umur 1 hari dalam “nutrient broth” diinokulasikan sebanyak 0,1 ml dengan metode tuang pada 12 ml “nutrient agar” dalam cawan petri (diameter 10 cm); dengan demikian diperkirakan jumlah bakteri 10⁵ sel /cawan petri. Pada setiap cawan petri diletakkan 4 kertas saring steril Whatman 42 berdiameter 10 mm pada permukaan agar sebagai penyerap sampel. Sebanyak 10 l sampel ditetaskan pada kertas saring tersebut, didiamkan selama 1 jam pada suhu kamar, lalu diinkubasikan pada suhu 30°C selama 18 jam.

Aktivitas anti-bakteri ditunjukkan dengan adanya zona jernih penghambatan pertumbuhan bakteri disekeliling kertas saring. Diameter zona jernih proporsional dengan besarnya aktivitas anti-bakteri; semakin besar diameter, aktivitas anti-bakteri semakin besar, demikian pula sebaliknya.

Hasil pengukuran diameter dikonversikan ke persen dari Oksitetrasiklin-HCl kontrol (tanpa pemanasan, tanpa protein dan tanpa zat besi) dengan asumsi bahwa diameter zona penghambatan larutan Oksitetrasiklin-HCl kontrol sama dengan 100% aktivitas anti-bakteri.

Rancangan Percobaan dan Analisis Statistik.

Percobaan dikerjakan dengan 3 ulangan dalam rancangan acak lengkap berpola faktorial 2x3x4, dengan faktor perlakuan yang diterapkan pada oksitetrasiklin adalah penambahan zat besi (A) yaitu a₀ = tanpa zat besi dan a₁ = dengan zat besi, pemanasan (B) yang meliputi b₀ = tanpa pemanasan, b₁ = pemanasan 70°C selama 20 menit dan b₂ = pemanasan 80°C selama 20 menit, dan penambahan protein telur (C) yang meliputi c₀ = tanpa protein, c₁ = ovalbumin, c₂ = konalbumin dan c₃ = fosvitin. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan, data dianalisis dengan prosedur General Linear Model (GLM) dari sistem SAS (SAS Institute Inc., 1990), dan perbedaan nyata diantara nilai tengah perlakuan diuji dengan Duncan's Multiple Range Test pada p<0.05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan dengan penambahan protein telur dan zat besi diperlihatkan pada Tabel 1.

Tampak bahwa protein telur berpengaruh sangat nyata (p<0,01) terhadap aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin. Akti-

vitasi anti-bakteri oksitetrasiklin lebih tinggi dengan adanya protein telur, baik ovalbumin, konalbumin maupun fosvitin. Zat besi berpengaruh sangat nyata (p<0,01) menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin. Pemanasan juga berpengaruh sangat nyata (p<0,01) menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin; semakin tinggi suhu pemanasan, aktivitas anti-bakterinya semakin berkurang.

Ada interaksi yang sangat nyata (p<0.01) antara protein telur, zat besi dan pemanasan dalam mempengaruhi aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin. Dengan tanpa zat besi, aktivitas oksitetrasiklin yang ditambah protein tanpa dipanaskan dan dipanaskan 70°C selama 20 menit tidak mengalami perubahan yang nyata (p>0.05). Namun dengan adanya zat besi, aktivitas anti-bakteri dari oksitetrasiklin baik tanpa maupun dengan adanya protein telur yang tidak dipanaskan menurun nyata, bahkan dengan pemanasan 70°C aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin tanpa protein sudah hilang, demikian pula dengan pemanasan 80°C selama 20 menit aktivitas anti-bakteri juga hilang walaupun ada ovalbumin, sedangkan dengan adanya konalbumin dan fosvitin aktivitas anti-bakteri masih terlihat namun sudah berkurang nyata (p<0,05) dibanding yang tanpa zat besi.

Hasil penelitian tersebut yang menunjukkan bahwa pemanasan menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin dan penambahan zat besi makin memperbesar penurunan dan bahkan menghilangkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin konsisten dengan hasil penelitian Hintono dkk. (2003). Adanya protein telur yang dapat mempertahankan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan 70°C selama 20 menit dan menghambat penurunan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan dengan adanya zat besi memberi petunjuk bahwa ketahanan residu oksitetrasiklin dalam telur terhadap

TABEL 1. AKTIVITAS ANTI-BAKTERI (%) OKSITETRASIKLIN YANG DIPANASKAN DENGAN PENAMBAHAN PROTEIN TELUR DAN ZAT BESI

Penambahan protein	Penambahan Zat besi	Tanpa pemanasan	Pemanasan 20 menit	
			70°C	80°C
OTC	Tanpa zat besi	100 ^{hi}	88.67 ^{gh}	63.73 ^{de}
	FeCl ₂	70.85 ^{def}	0 ^a	0 ^a
OTC + Ovalbumin	Tanpa zat besi	102.36 ^{hi}	102.62 ^{hi}	88.4 ^{gh}
	FeCl ₂	67.99 ^{def}	33.72 ^{bc}	0 ^a
OTC + Konalbumin	Tanpa zat besi	111.67 ⁱ	108.58 ⁱ	77.53 ^{efg}
	FeCl ₂	71.87 ^{def}	39.32 ^c	20.08 ^b
OTC + Fosvitin	Tanpa zat besi	105.67 ^{hi}	99.55 ^{hi}	79.11 ^{fg}
	FeCl ₂	58.62 ^d	30.08 ^{bc}	20.03 ^b

OTC = oksitetrasiklin

^{a-i} Superskrip huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0.05)

panas disebabkan oleh pengaruh dari protein yang terkandung dalam telur.

Ovalbumin merupakan protein pada putih telur dalam jumlah terbesar diikuti oleh konalbumin sedangkan fosvitin merupakan salah satu protein utama pada kuning telur. Pada suhu 84.5°C ovalbumin mengalami denaturasi (Powrie dan Nakai, 1990); diduga dengan pemanasan 80°C selama 20 menit ovalbumin sudah mengalami denaturasi yang diikuti dengan pelepasan ikatan dengan oksitetrasiklin dan kemudian oksitetrasiklin membentuk kompleks dengan zat besi. Hal ini mungkin berakibat hilangnya aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan 80°C dengan penambahan ovalbumin dan zat besi. Konalbumin walaupun terdenaturasi pada suhu 61°C (Powrie dan Nakai, 1990), namun bila membentuk kompleks dengan ion logam termasuk zat besi maka kompleks tersebut tahan terhadap denaturasi panas; demikian pula fosvitin dapat mengikat logam termasuk zat besi (Juneja dan Kim, 1997) dan kompleks fosvitin-besi stabil terhadap pemanasan sampai 90°C (Castellani dkk., 2004). Diduga karena stabilnya ikatan antara konalbumin dan fosvitin dengan zat besi akan mengurangi kemampuan besi untuk menginaktifkan oksitetrasiklin, sehingga aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan pada 80°C dengan penambahan konalbumin atau fosvitin dan zat besi masih terlihat. Walaupun aktivitas anti-bakterinya masih terlihat namun sudah nyata berkurang bila dibandingkan dengan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin yang dipanaskan pada suhu 80°C hanya dengan penambahan konalbumin dan fosvitin; hal ini memberikan petunjuk bahwa zat besi berpotensi untuk menghilangkan aktivitas anti-bakteri residu oksitetrasiklin dalam telur.

KESIMPULAN

Protein telur dapat mempertahankan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin pada pemanasan 70°C selama 20 menit dan menghambat penurunan aktivitas anti-bakteri pada pemanasan 80°C selama 20 menit, sedangkan zat besi dapat menurunkan aktivitas anti-bakteri oksitetrasiklin sekalipun ada protein baik tidak dipanaskan maupun dipanaskan 70°C selama 20 menit. Pada proses pemanasan, konalbumin dan fosvitin mengurangi kemampuan zat besi dalam menginaktifkan oksitetrasiklin.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, S.L. (1984). Tetracycline Hydrochloride. *Dalam*: Florey, K. (ed.). *Analytical Profile of Drug Substances*. Vol. 13:597-653. Academic Press, Inc., Orlando.

Castellani, O., Guerin-Dubiard, C., David-Briand, E., dan Anton, M. (2004). Influence of physicochemical condi-

tions and technological treatments on the iron binding capacity of egg yolk. *Food Chemistry*. 85:569-577.

- Connors, K.A., Amidon, G.L., dan Stella, V.J. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. John Wiley and Sons, New York.
- Cook, H.J., Mundo, C.R., Fonseca, L., Gasque, L., dan Moreno-Esparza, R. (1993). Influence of the diet on bioavailability of tetracycline. *Biopharm. Drug Disposition*. 14:549-553.
- Donoghue, D.J. dan Hairston, H. (1999). Oxytetracycline transfer into chicken egg yolk or albumen. *Poult. Sci.* 78:343-345.
- Fedeniuk, R.W., Shand, P.J., dan McCurdy, A.R. (1997). Effect of thermal processing and additives on the kinetics of oxytetracycline degradation in pork muscle. *J. Agric. Food Chem.* 45:2252-2257.
- Higuchi, T. dan Bolton, S. (1959). The solubility and complexing properties of oxytetracycline and tetracycline. III. Interaction in aqueous solution with model compounds, biochemicals, metals, chelates, and hexameta-phosphate. *J. Am. Pharm. Assoc.* 48:557-564.
- Hintono, A., Astuti, M., Wuryastuti, H., dan Rahayu, E.S. (2003). Efek interaksi oksitetrasiklin dan mineral yang dipanaskan terhadap aktivitas anti-bakteri. *Prosiding Seminar Nasional PATPI*. Yogyakarta, 22-23 Juli 2003. Hal 288-294.
- Juneja, L.R. dan Kim, M. (1997). Egg yolk protein. *Dalam*: Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H., dan Kim, M. (ed.). *Hen Eggs; Their Basic and Applied Science*, hal 57-71. CRC Press., Washington D.C.
- Katz, S.E dan Brady, M.S. (1993). Antibiotic residues in food and their significance. *Dalam*: P.M. Davidson dan A.L. Branen (ed.). *Antimicrobial in Foods*, hal. 571-595. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. dan Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International, Inc.
- Markakis, P. (1992). Determination of oxytetracycline residues in hens' eggs by microbiological method. *Anim. Sci. Rev.* 15:91-102.
- Jianghong, M., Zhao, S., Doyle, M.P., dan Joseph, S.W. (1998). Antibiotic resistance of Escherichia coli O157 : H7 and O157 : NM isolated from animals, food, and humans. *J. Food Prot.* 61:1511-1514.
- Meredith, W.E., Weiser, H.H., dan Winter, A.R. (1965). Chlortetracycline and oxytetracycline residues in poultry tissues and eggs. *Appl. Microbiol.* 13:86-88.

- Moats, W.A. (1998). Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates – A Review. *J.Food Prot.* 51:491-497.
- Nagy, J., Sokol, J., Turek, P., Korimova, L. dan Rozanska, H. (1997). Residue of oxytetracycline in egg white and yolk after medication of laying hens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.* 41:141-147.
- Omija, B., Mitema, E.S. dan Maitho, T.E. (1994). Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens. *Food Addit. Cont.* 11:641-647.
- Osuga, D.T dan Feeney, R.E. (1977). Egg proteins. *Dalam: Whitaker, J.R. dan Tannenbaum, S.R. (ed.). Food Proteins*, hal 209-266. Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Powrie, W.D. dan Nakai, S. (1990). The chemistry of eggs and egg products. *Dalam: W.J. Stadelman dan O.J. Cotterill (ed.). Egg Science and Technology*, hal 97-139. Food Product Press, New York.
- Rose, M.D., Bygrave, J, Farrington, W.H.H. dan Shearer, G. (1996). The effect of cooking on veterinary drug residues in food. 4. Oxytetracycline. *Food Addit. Cont.* 13:275-286.
- Ruyck, H., deRidder, H., vanRenterghem, R. dan vanWambeke, F. (1999). Validation of HPLC method of analysis of oxytetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to feeding trial. *Food Addit. Cont.* 1:47-56.
- SAS Institute Inc. (1990). SAS/STAT User's Guide. Version 6, Vol. 2. 4th Ed. Cary, NC : SAS Institute Inc.
- Yoshimura, H., Osawa, N., Rosa, F.S., Hermawati, D., Isriyanthi, N.M. dan Sugimori, T. (1991). Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hens. *Food Addit. Cont.* 8:65-69.