

## PURIFIKASI DAN PROFIL PROTEIN OVOTRANSFERRIN DARI EGG SHELL MEMBRANE TELUR AYAM RAS DAN BURAS

[Purification and Protein Analysis of Ovotransferrin from Eggshell Membrane of Local Indonesia and Leghorn Hens]

Risa Fazriyati Siregar<sup>1)</sup>, Ahmad Ni'matullah Al-Baarri<sup>2)\*</sup>, Antonius Hintono<sup>2)</sup>,  
Yoyok Budi Pramono<sup>2)</sup>, dan Setya Budi Muhammad Abduh<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Magister Ilmu Ternak, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang

<sup>2)</sup> Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang

Diterima 14 Maret 2016 / Disetujui 19 Juni 2016

### ABSTRACT

Eggs consumption in Indonesia increases every year resulting in egg shell waste. In addition, the functional components including ovotransferrin existing in this waste has not been yet studied well. This research has been done to explore ovotransferrin in egg shell membrane from local Indonesia and leghorn hens. The ion exchange chromatography using SP-Sepharose Fast Flow was used to purify the ovotransferrin from egg shell membrane. The fractions from salt elution were analyzed for protein concentration and protein profile using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE). The result showed that the best concentration of salt elution to obtain ovotransferrin was 0.1 mM NaCl since the single band was detected among other fractions. The ovotransferrin concentration (%) per single egg was also calculated as much as  $0.75 \pm 0.017$  and  $0.16 \pm 0.005$  for leghorn dan local Indonesia hen, respectively. This result may provide the beneficial information to purify ovotransferrin from egg shell membrane which conceivably as a food preservative agent.

**Keywords:** eggshell membrane, layer, native Indonesia hen, ovotransferrin, protein profile

### ABSTRAK

Konsumsi telur di Indonesia mengalami peningkatan setiap tahunnya yang mengakibatkan banyaknya limbah kerabang telur yang dihasilkan. Bagian dalam membran cangkang telur merupakan komponen yang belum banyak dimanfaatkan untuk kepentingan pangan padahal di dalamnya terkandung protein fungsional *ovotransferrin*. Tujuan penelitian ini adalah memurnikan (purifikasi) komponen *ovotransferrin* dari membran cangkang telur ayam ras dan buras serta menganalisisnya. *Ovotransferrin* dipurifikasi melalui metode *ion exchange chromatography* dengan resin *SP Sepharose Fast Flow*. Profil protein dari fraksi-fraksi hasil elusi yang sudah didapat dianalisis dengan SDS - PAGE. Hasil elusi yang terbaik untuk purifikasi *ovotransferrin* ini adalah dengan menggunakan elusi dengan larutan 0,1 mM NaCl karena terbukti telah berhasil mengeliminasi protein lain. Berdasarkan perhitungan jumlah protein didapatkan hasil bahwa membran cangkang telur ayam ras dan buras mengandung *ovotransferrin* masing-masing sebesar  $0,75 \pm 0,017$  dan  $0,16 \pm 0,005\%$ . Keberhasilan purifikasi *ovotransferrin* dari membran cangkang kulit telur diharapkan dapat membuka peluang pemanfaatan *ovotransferrin* untuk berbagai keperluan, misalnya sebagai senyawa antibakteri yang aman untuk pangan.

**Kata kunci:** buras, membran cangkang kulit telur, *ovotransferrin*, profil protein, ras

### PENDAHULUAN

Telur merupakan salah satu bahan pangan yang selain berfungsi sebagai sumber protein, juga telah dikenal sifat fungsionalnya sebagai agen untuk daya buih pengemulsi, serta pembuat gel (Ayadi et

al., 2008). Telur buras dan ras merupakan telur yang dominan dikonsumsi oleh masyarakat. Tidak terdapat perbedaan yang mencolok antara nutrisi telur ayam buras dan ras namun demikian telur ayam ras lebih banyak dijumpai di pasar.

Kandungan protein yang terdapat pada telur, selain memberikan nilai nutrisi yang tinggi, juga memiliki sifat fungsional sebagai antimikroba yang dapat diaplikasikan pada makanan dan obat-obatan,

\*Penulis Korespondensi:  
E-mail: albari@undip.ac.id

seperti *imunoglobulin avidin*, *ovotransferrin*, dan lisozim (Stadelman, 2000; Charter dan Lagarde, 2014). Kandungan peroteini tersebut, tidak hanya terdapat pada albumin dan kuning telur namun juga terdapat pada membran telur yang merupakan lapisan bagian dalam dari cangkang telur dan merupakan bagian terkecil dari struktur telur utuh yaitu sekitar 10% dari berat telur (Kamkum *et al.*, 2015). Oleh karena kerabang telur kaya akan mineral seperti kalsium karbonat, kalsium fosfat, magnesium karbonat (Kamkum *et al.*, 2015), kerabang telur banyak diaplikasikan untuk industri pupuk dan pakan ternak, pengisi dalam polimer, agen untuk menyerap logam berat seperti Cu, Cr, dan Cd (Kamkum *et al.*, 2015). Namun demikian, pemanfaatan membran bagian dalam cangkang telur, belum tereksplorasi dengan baik.

Membran kerabang telur, merupakan bagian terkecil dari kerabang telur yang memiliki berat sekitar 5% dari berat kerabang dan tersusun dari kalsium karbonat dan matriks organik (sekitar 3,5%) yang terdiri dari glikoprotein, proteoglikan (Soekarto, 2013) glikosaminoglikan seperti dermatan sulfat dan kondroitin sulfat, glikoprotein sulfat termasuk *hexosamines* (Ruff *et al.*, 2009). Membran kerabang telur mengandung beberapa protein yaitu lisozim, *ovotransferrin*, desmozine, ovalbumin, ovocalyxin-36, dan isodesmozine. Protein *ovotransferrin* dan lisozim memiliki fungsi sebagai agen antibakteri (Wu dan Alexandra, 2012; Balaz, 2014). Selain sebagai antibakteri *ovotransferrin* juga merupakan pengangkut (*transporter*) besi untuk embrio yang sedang berkembang (Wu dan Alexandra, 2012). *Ovotransferrin* termasuk dalam golongan protein utama dalam putih telur (12% dari putih telur) dan memiliki berat molekul sebesar 78 kDa (Hinckea *et al.*, 2008), serta banyak dijumpai dalam membran kerabang telur yang memiliki fungsi utama sebagai agen antibakteri (Ko *et al.*, 2008). *Ovotransferrin* sebagai antibakteri masih belum banyak dimanfaatkan dalam bidang pangan tetapi sudah terbukti dapat membunuh bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Varon *et al.*, 2013).

Mekanisme *ovotransferrin* sebagai antibakteri adalah keberadaan komponen glikoprotein yang mengikat Fe dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga membatasi ketersediaan Fe melalui khelasi dengan membentuk *ovotransferrin* Fe jenuh (holo *ovotransferrin*) (Varon *et al.*, 2013). *Ovotransferrin* berperan sebagai agen antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Varon *et al.*, 2013; Ibrahim, 2000) *Pseudomonas sp* dan *Salmonella mutans* (Wu dan Alexandra, 2012).

Kadar *ovotransferrin* tinggi ketika terjadi ovulasi pada unggas. Ovulasi merupakan pelepasan telur dari ovarium. Pada tahap ini *ovotransferrin* berfungsi

untuk melindungi kuning telur yang merupakan bakal embrio dari serangan mikroorganisme. Pada unggas *ovotransferrin* terdapat pada bagian saluran telur, setelah telur lepas dari ovarium maka *ovotransferrin* disimpan pada albumin telur dan berfungsi sebagai agen anti bakterisida. Kandungan *ovotransferrin* pada putih telur sebanyak 13% (Wu dan Alexandra, 2012). Faktor utama yang mempengaruhi *ovotransferrin* adalah pakan yang memenuhi kebutuhan nutrisi ayam. Kecukupan kebutuhan nutrisi mendukung kesehatan ayam, sehingga berdampak pada produksi *ovotransferrin* yang tinggi sebagai salah satu bagian proses pembentukan telur. Pakan sangat berpengaruh terhadap produktivitas telur, tingkat kontaminasi mikroba patogen yang rendah, serta membentuk kandungan protein dan  $\beta$  karoten (Urip *et al.*, 2008). Membran cangkang telur mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Ko *et al.*, 2008), terutama dalam pengawetan pangan. Hingga saat ini belum banyak langkah aplikatif untuk memurnikan *ovotransferrin* dari membran cangkang telur. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan upaya purifikasi *ovotransferrin* dari membran cangkang telur menggunakan metode *ion exchange chromatography*. Penelitian ini sangat bermanfaat dalam memberikan informasi tentang cara purifikasi *ovotransferrin* dari membran cangkang telur yang kelak dapat digunakan secara luas di bidang pengawetan pangan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Telur sebagai sampel penelitian didapat dari peternakan ayam ras dan ayam buras di Kelurahan Mijen, Semarang. Penelitian ini dilakukan mulai bulan Februari–September 2015 dan dilakukan di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro serta Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro. Telur yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur ayam ras dan ayam buras segar yang didapatkan pada pagi hari dengan berat masing-masing sebesar  $60 \pm 4,3$  dan  $45 \pm 6,7$  g. Telur ayam ras dan buras yang digunakan masing-masing sebanyak 2 kg terdiri dari 40 butir telur ayam ras dan 50 butir telur ayam buras. Membran cangkang telur langsung segera dipisahkan dari telur dan dikumpulkan menjadi satu, disimpan dalam refrigerator bersuhu  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  maksimal 24 jam. Proses pemisahan membran dari kerabang telur dilakukan secara manual tanpa adanya penambahan bahan kimia.

### Pemurnian *ovotransferrin* dari membran kerabang

Protein *ovotransferrin* dari dimurnikan menggunakan modifikasi metode dari penelitian Naknu-kool *et al.* (2009). Hal yang dimodifikasi adalah penambahan 0,01 mM HCl untuk menurunkan pH *membrane* dan penggunaan larutan pencuci resin. *Membrane* yang sudah didapat dari 2 kg telur, kemudian dipotong menjadi bagian kecil dengan ukuran mendekati 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup> dengan menggunakan alat berupa gunting, yang selanjutnya direndam di dalam 0,05 mM *sodium-phosphate buffer* (PB) pH 7,5 dibuat dari NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O dan NaHPO<sub>4</sub> (Himedia, India). Campuran tersebut kemudian diaduk dengan *Ultra Turax Homogenizer* (IKA® T25) yang berkecepatan 6000 x g. Nilai pH campuran diturunkan menjadi 6,0 dengan penambahan 0,01 mM HCl (Panreuc Quimica SAU, Barcelona) secara bertahap. Campuran disentrifugasi (HETTICH EBA 20, Germany) pada kecepatan 6000 x g selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dialirkan melalui kolom vertikal terbuka dengan diameter 5 cm yang telah diisi 10 g resin *SP-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare Bio-Science AB, Sweeden, Lot number 10081054). Resin ini terlebih dahulu dibersihkan dari sisa komponen yang tidak diinginkan dengan cara dialiri 10 mM PB pH 7,0 sebanyak 300 mL. Setelah campuran membran dalam PB dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan, lalu secara berurutan, kolom dialiri dengan 10 mM PB pH 7,0 yang masing-masing mengandung 0,1; 0,3; dan 0,5 mM NaCl (Merck, Germany). Volume setiap konsentrasi yang dialirkan adalah sebanyak 30 mL dan hasil elusi kemudian ditampung ke dalam tabung ultrasentrifus (Biologix, China) berukuran 15 mL (sebanyak 10 mL per tabung). Larutan yang telah ditampung kemudian disimpan di dalam *refrigerator* dengan suhu 6°C dan langsung digunakan untuk penelitian tahap selanjutnya.

### Analisis kualitatif kadar protein

Analisis kualitatif kadar protein dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer (UV Mini Shimadzu, China) pada panjang gelombang 280 nm. Analisis kadar protein dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 280 nm ini dilakukan dengan menuangkan 3 mL fraksi hasil elusi dari kromatografi kolom terbuka ke dalam *cuvette* dan langsung diukur absorbansinya segera setelah *cuvette* dimasukkan ke dalam spektrofotometer (Touch *et al.*, 2004). Kadar protein sampel dalam %, diprediksi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Protein} = \frac{A_{280}}{1,5}$$

Keterangan:

A<sub>280</sub> : Absorbansi pada panjang gelombang 280 nm  
1,5 : Faktor koreksi protein

### Analisis profil protein

Analisis protein menggunakan elektroforesis (GE Healthcare Bio-Science AB, Sweeden). Profil protein membran kerabang dianalisis dengan menggunakan *sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Sampel sebanyak 15 µL dari masing-masing fraksi dicampur dengan SDS *sample buffer* sebanyak 15 µL dan *mercaptoetanol* (BioChemica, Inggris) sebanyak 3 µL lalu sampel dimasukkan ke dalam air mendidih selama 2 menit. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel sebanyak 15 µL untuk setiap sumur dan perangkat elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik bertegangan 60 V 12 mA selama 6 jam. Gel dilepas dan diwarnai dengan pewarna *Coo-masie Brilliant Blue* (CBB) selama 60 menit lalu dicuci dengan larutan *staining CBB* yang terdiri dari asam asetat (Merck, Germany) dan alkohol (MKR Chemicals, Indonesia) untuk mendapatkan *band* pada gel.

### Analisis kuantitatif kadar protein

Analisis kadar protein secara kuantitatif dilakukan berdasarkan metode *Bradford*. Pengukuran kadar protein dengan metode *Bradford* terdiri atas dua tahap. Tahap pertama pembuatan larutan kit (kit *Bradford*) yang terdiri dari campuran 10 mg *Brilliant Blue* (MKR Chemicals, Indonesia) dan 50 mL ethanol (Merck, Germany). Selanjutnya campuran ini dilarutkan ke dalam 100 mL. Selanjutnya campuran ini dilarutkan ke dalam 100 mL asam fosfat (MKR Chemical, Indonesia). Larutan kit ini kemudian diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1:2. Tahap kedua adalah menganalisis kadar protein sampel dengan cara melarutkan 100 µL campuran final dengan 3 mL *Kit Bradford*. Setelah dibiarkan selama 2 menit, selisih absorbansi dibaca pada spektrofotometer (UV Mini Shimadzu, Japan) pada panjang gelombang 465 nm (Bradford, 1976). Kadar protein ditetapkan menggunakan kurva standar ovalbumin murni dengan kadar 0,5–5,0%.

### Analisis data

Penelitian ini menggunakan analisis data deskriptif kuantitatif dan kualitatif yaitu dengan cara membandingkan nilai hasil pengamatan pada masing-masing tahapan untuk menentukan hasil yang terbaik (Fahardian *et al.*, 2012). Fenomena yang tampak pada data yang diperoleh diklarifikasi dan dideskripsikan dengan menghubungkan sejumlah variabel lain yang berkaitan dengan parameter yang diteliti. Data kuantitatif berupa nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dan persentase kadar protein. Data kualitatif yang diambil adalah profil SDS-PAGE. Deskripsi digunakan dalam menggabungkan antar parameter dan antar jenis sampel telur ayam ras dan buras. Hasil yang diperoleh tersebut diakumulasikan secara

bersama-sama untuk menarik kesimpulan dan saran yang tepat untuk melaksanakan penelitian sejenis dengan baik.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Proses purifikasi *ovotransferrin*

Purifikasi menggunakan resin *SP-Sepharose Fast Flow* untuk mengimobilisasi protein *ovotransferrin* dari membran kerabang telur bertujuan agar *ovotransferrin* dapat digunakan secara berulang-ulang. Hal ini dikarenakan penggunaan *ovotransferrin* yang sangat sedikit dalam pengaplikasian dan proses yang sulit untuk memperoleh *ovotransferrin*. Penggunaan resin *SP-Sepharose Fast Flow* dinilai cukup tepat, hal ini dikarenakan *SP-Sepharose Fast Flow* memiliki senyawa yang bermuatan negatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses pemisahan *ovotransferrin* dari membran kerabang telur ayam buras dan ras dinilai tidak berbeda yang mencolok. Kedua jenis membran kerabang telur ini keduanya tergolong sulit dilepaskan dari kerabang telur, hal ini dikarenakan membran kerabang telur yang sangat tipis.

Proses pengaliran campuran membran kerabang telur dalam PB berlangsung agak lambat dengan kecepatan alir rata-rata mencapai  $0,6 \pm 0,05$  mL/menit (Tabel 1). Hal ini dimungkinkan karena jumlah padatan yang masih tersisa tinggi sehingga memperlambat laju alir di dalam kolom. Padatan yang tersisa berupa partikel-partikel halus membran kerabang telur yang lolos selama penyaringan. Untuk mengoptimalkan hasil pemisahan protein yang ada pada kolom, maka dialirkan larutan garam.

Tabel 1. Parameter visual setiap hasil elusi *ion exchange chromatography*

Parameter	Membran Kerabang Telur	
	Ras	Buras
Kecepatan alir (mL/menit)	0,65	0,60
Jumlah tabung penampung berisi fraksi berwarna kuning emas	3	4
Jumlah tabung penampung berisi fraksi yang agak berwarna kuning	4	3
Jumlah tabung penampung berisi fraksi yang jernih	3	3
Kejernihan pradilusi ke dalam kolom	Agak jernih	Agak jernih
Bau eluent	Tidak berbau	Tidak berbau

Secara visual, fraksi-fraksi ini mempunyai tingkat penampakan agak keruh dengan warna kekuning-kuningan. Namun beberapa fraksi terlihat berwarna jernih, tidak ada penampakan warna

kuning didalamnya (Tabel 1). Tidak ada perbedaan warna yang mencolok antara fraksi kelompok sampel ayam ras dan buras. Hal ini dimungkinkan karena tidak ada perbedaan yang mencolok pada jumlah protein kedua jenis telur ini. Berdasarkan pada hasil pengamatan sebagaimana yang tercantum dalam Tabel 1, kedua jenis telur menghasilkan fraksi dengan warna kuning keemasan, dimana pada telur ayam ras terdapat 3 fraksi yaitu fraksi 1 hingga fraksi 3 dan pada telur ayam buras terdapat 4 fraksi yaitu fraksi 1 hingga fraksi 4. Perbedaan warna pada fraksi-fraksi ini menandakan seberapa besar *ovotransferrin* mengikat besi, semakin besar *ovotransferrin* mengikat besi maka warna fraksi akan berwarna kekuningan (keruh) dan semakin sedikit *ovotransferrin* mengikat besi maka warna fraksi akan terlihat jernih. Hal ini karena *ovotransferrin* termasuk dalam golongan glikoprotein yang dapat mengikat besi. Fenomena ini juga diduga adanya komponen protein dengan persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi-fraksi lain. Semakin kuning (keruh) warna fraksi maka semakin tinggi kandungan proteinnya dan sebaliknya, semakin jernih warna fraksi maka kandungan proteinnya semakin rendah.

### Kadar protein kualitatif

Pada Tabel 2 dapat dicermati bahwa nilai absorbansi tertinggi, terdapat pada fraksi 1 dengan nilai absorbansi mencapai 0,535 (atau dengan prediksi kandungan protein sebesar 0,356%), artinya bahwa fraksi 1 ini mempunyai konsentrasi protein yang tertinggi diantara fraksi-fraksi lain. Nilai absorbansi yang tertinggi ini belum tentu memiliki tingkat kemurnian protein yang tinggi oleh karena itu, pada tahap penelitian berikutnya dilakukan analisis profil protein dengan SDS-PAGE untuk mengetahui kemurnian protein.

Beberapa peneliti enzim, pada umumnya mendapatkan hasil absorbansi fraksi yang kurang dari 1,00 (Naknukool *et al.*, 2009; Al-Baarri *et al.*, 2010). Hasil absorbansi yang menunjukkan angka kurang dari 1,00 tergolong angka yang sensitif dan dapat mengetahui pola perubahan absorbansi masing-masing fraksi. Hasil absorbansi pada penelitian ini berkisar 0,121-0,535 yang artinya masih dalam angka di bawah 1,00. Sensitivitas nilai absorbansi sangat bervariasi ditunjukkan pada Tabel 2.

Purifikasi protein yang dilakukan oleh Naknukool *et al.* (2009), menggunakan larutan pendahuluan berupa *acetate buffer* molaritas rendah (10 mM), yang berguna untuk memisahkan senyawa pengganggu termasuk sisa lemak dan mineral. Namun dalam penelitian ini, tidak digunakan *buffer* tersebut karena hasil elusi fraksi pertama dinilai sudah jernih dan tidak keruh.

Tabel 2. Nilai absorbansi (280 nm) dan prediksi total protein yang terkandung dalam fraksi

Nama Fraksi	Fraksi Telur Ayam Ras		Fraksi Telur Ayam Buras	
	Nilai Absorbansi	Prediksi Kadar Protein (%)*	Nilai Absorbansi	Prediksi Kadar Protein (%)*
Fraksi 1	0,535	0,357	0,472	0,315
Fraksi 2	0,233	0,155	0,341	0,227
Fraksi 3	0,193	0,129	0,250	0,167
Fraksi 4	0,183	0,122	0,295	0,197
Fraksi 5	0,173	0,115	0,250	0,167
Fraksi 6	0,220	0,147	0,187	0,125
Fraksi 7	0,121	0,081	0,177	0,118
Fraksi 8	0,145	0,001	0,159	0,106
Fraksi 9	0,268	0,178	0,146	0,100

Keterangan: Fraksi 1–3: elusi dengan 0,1 mM NaCl, fraksi 4–6: elusi dengan 0,3 mM NaCl, fraksi 7–9: elusi dengan 0,5 mM NaCl. \*Dihitung dengan membagi nilai absorbansi dengan 1,5

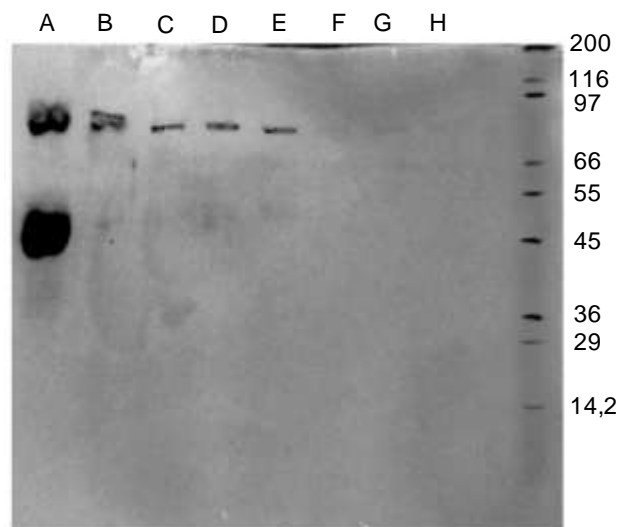
Puncak nilai absorbansi, fraksi yang tertinggi pada penelitian Naknukool *et al.* (2009), ditunjukkan pada fraksi yang dielusikan dengan 0,5 mM NaCl dengan nilai absorbansi sekitar 2,50 sedangkan pada penelitian ini, absorbansi yang tertinggi dicapai pada fraksi 1 yang merupakan hasil elusi dari 0,1 mM NaCl. Nilai absorbansi sangat bergantung pada zat yang dipurifikasi. Semakin tinggi kandungan protein, maka semakin tinggi nilai puncak absorbansi. Naknukool *et al.* (2009) menggunakan putih telur yang mempunyai kandungan protein sebesar 88,63% (Ayadi *et al.*, 2008) sedangkan pada penelitian ini, digunakan membran telur yang hanya mempunyai kandungan protein berkisar 3,5–4,0%, sehingga terjadi perbedaan yang cukup mencolok pada nilai absorbansi titik tertingginya.

### Profil protein

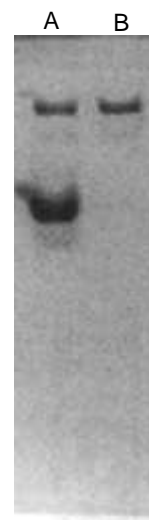
Profil protein membran kerabang telur dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE. Uji SDS-PAGE ditampilkan pada Gambar 1 yang menunjukkan profil protein membran kerabang telur ayam ras sebelum purifikasi (*lane A*) dan setelah purifikasi (*lane B–H*).

*Lane B* sampai dengan *H* (Gambar 1) adalah tampilan protein hasil dari fraksi yang telah mengalami tahapan purifikasi. Setelah melalui tahapan ini, tampak terdapat pengurangan jumlah *band*, dari dua *band* menjadi hanya satu *band*, yaitu *band* dengan berat molekul sekitar 78 kDa yang merupakan *ovotransferrin*. Hasil profil SDS-PAGE ini dapat digunakan untuk menarik kesimpulan bahwa proses purifikasi dapat berhasil dengan baik dan hanya menyisakan satu protein saja, yaitu *ovotransferrin* dalam fraksi yang diperoleh pasca purifikasi. Intensitas *band* dapat diartikan sebagai indikator banyak tidaknya kandungan protein dalam sampel (Mahasri *et al.*, 2010). Gambar 2 menunjukkan profil protein membran kerabang telur ayam

buras sebelum purifikasi (*lane A*) dan setelah purifikasi (*lane B*).



Gambar 1. Profil protein membran kerabang telur ayam ras. *Lane A*: membran kerabang telur dalam larutan *buffer*, *Lane B–D*: fraksi dari elusi dengan 0,1 mM NaCl; *Lane E–G*: fraksi elusi 0,3 mM NaCl; *Lane H* fraksi dari elusi 0,5 mM NaCl



Gambar 2. Profil protein membran kerabang telur ayam buras. *Lane A*: sebelum purifikasi; *Lane B*: hasil purifikasi dielusikan dengan 0,1 mM NaCl

*Band* yang terdapat pada *lane B* pada Gambar 2 adalah *band* yang didapat dari fraksi yang mengandung *ovotransferrin*. Penentuan *ovotransferrin* pada SDS-PAGE didukung juga dengan senyawa standar yang telah dilakukan pada Gambar 1. Senyawa standar tidak memiliki *band* lain di antara berat molekul 66–97 kDa sehingga *band* yang muncul pada rentang 66–97 kDa adalah protein

dominan pada membran kerabang telur, yaitu *ovotransferrin* yang memiliki berat 78 kDa. *Ovotransferrin* memiliki berat molekul 78 kDa dengan 686 asam amino dan titik isoelektrik 6,1 dan termasuk dalam protein dominan pada membran kerabang telur (Ko dan Ahn 2008; Abeyrathne *et al.*, 2014). *Band* tunggal yang muncul pada SDS PAGE menunjukkan bahwa *ovotransferrin* murni, yaitu terletak pada *lane* C, D, E. Fraksi-fraksi ini adalah fraksi yang didapat dari hasil elusi 0,1 mM NaCl.

*Lane* A baik pada Gambar 1 dan 2, menunjukkan terdapatnya ovalbumin dan *ovotransferrin* yang terdeteksi dengan berat molekul masing-masing 45 dan 78 kDa (penentuan berat molekul ini, berdasarkan pada tampilan protein marker yang digunakan di *lane* paling kanan Gambar 1). Hal ini dapat dipastikan bahwa komponen tersebut adalah ovalbumin dan *ovotransferrin* karena komponen mayor protein pada *eggshell membrane* hanyalah ovalbumin dan *ovotransferrin* yang hanya dapat dipisahkan melalui *strong cation exchanger* (Naknukool *et al.*, 2009; Wu dan Alexandra, 2012). Kandungan ovalbumin dalam putih telur cukup besar yaitu 54% (Mann dan Mann 2011; Deleu *et al.*, 2015), sehingga kandungan ovalbumin di *eggshell membrane* juga besar. Kandungan *ovotransferrin* pada putih telur sebanyak 13% (Wu dan Alexandra, 2012). Kandungan protein lain yang terdapat pada *eggshell membrane* merupakan protein minor yaitu lisozim, ovocalyxin-36 dan demozine (Balaz, 2014) sehingga tidak dapat muncul dalam profil protein dengan menggunakan SDS-PAGE. Berdasarkan Gambar 1 dan 2, maka hanya fraksi yang didapat dari elusi 0,1 mM NaCl yang digunakan untuk penelitian lebih lanjut.

#### Kadar protein kuantitatif

Tabel 3. menunjukkan kadar protein yang terlarut. Fraksi 1 sampai dengan 4 dipilih untuk dianalisis kadar protein secara kuantitatif karena hasil nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm untuk fraksi 1-4 menunjukkan nilai absorbansi yang berada pada kisaran 0,2-0,5 pada *peak* pertama dan hasil analisis profil protein yang menunjukkan adanya *band* pada 78 kDa dan tidak terdapat *band* yang jelas pada fraksi-fraksi setelah fraksi ketiga. Fraksi keempat dan kelima diikutsertakan dalam analisis kadar protein ini dimaksudkan untuk melakukan pemeriksaan apakah masih terdapat protein dalam sampel.

Berdasarkan Tabel 3 didapat hasil bahwa kadar protein dapat terdeteksi pada fraksi 1-3 pada kedua jenis sampel, namun untuk sampel telur ayam buras, masih terdeteksi ada protein pada fraksi nomer 4. Protein pada fraksi nomer 4 ini diduga adalah protein bukan *ovotransferrin* karena fraksi nomer 4 ini *band* tidak muncul sama sekali setelah

dilakukan analisis profil protein dengan menggunakan SDS-PAGE.

Tabel 3. Kadar protein kuantitatif (%) fraksi 1 sampai 4 hasil elusi sampel dari telur ayam ras dan buras yang ditentukan dengan metode *Bradford*

Nomor Fraksi	Jenis Telur	
	Ras	Buras
Fraksi 1	7,8±0,16	1,2±0,09
Fraksi 2	4,4±0,10	1,0±0,03
Fraksi 3	2,8±0,07	1,8±0,05
Fraksi 4	0	1,6±0,06
Fraksi 5	0	0

Keterangan: Fraksi 1-3 dipilih karena mempunyai tingkat kemurnian protein yang tinggi. Fraksi 4 dipilih untuk sampling fraksi yang tidak menghasilkan *band* berdasarkan analisis SDS-PAGE yang telah dilakukan pada tahapan sebelumnya

Penjumlahan seluruh fraksi dari 1-3 pada telur ayam ras memberikan hasil sebesar 15±0,33% yang menunjukkan bahwa dari seluruh larutan membran kerabang telur (200 g membran kerabang telur dalam 300 mL *buffer*) terdapat *ovotransferrin* sebanyak 15±0,33% dari total protein dalam membran kerabang telur. Guna mendapatkan 200 g membran kerabang telur, diperlukan 40 butir telur ayam ras, sehingga dapat dihitung bahwa setiap telur terkandung 0,75±0,017% *ovotransferrin*. Pola perhitungan ini jika diaplikasikan pada telur ayam buras, maka didapat hasil sebesar 4% (dari hasil penjumlahan kadar protein pada fraksi 1-3), sehingga dari 200 g membran kerabang telur (untuk mendapatkannya, diperlukan 50 butir telur ayam buras), terdapat *ovotransferrin* sebanyak 8±0,23% dan dalam satu butir telur 0,16±0,005% *ovotransferrin* pada membran kerabang telur.

Berdasarkan perhitungan tersebut, jumlah *ovotransferrin* pada membran kerabang telur ayam ras adalah 4,6 kali lipat lebih besar daripada *ovotransferrin* telur ayam buras. Hal ini dimungkinkan karena terkontrolnya konsumsi protein yang pada ayam ras dibandingkan pada ayam buras. Berdasarkan penelitian Ketaren (2010), kebutuhan protein ayam petelur adalah berkisar 15-17% dan bergantung pada masa pertumbuhannya. Jika dilihat dari pola pemberian pakan ayam ras, peternak selalu menjaga kualitas pakan (terutama kadar protein) guna memenuhi kebutuhan protein. Sebaliknya, kebutuhan protein ayam buras cenderung tidak terjaga karena didapat dari pola pemberian pakan yang tidak terpola sehingga dapat menyebabkan asupan protein yang kurang. Faktor inilah yang menyebabkan kadar *ovotransferrin* pada ayam buras lebih rendah dibandingkan ayam ras.

## KESIMPULAN

Pemurnian *ovotransferrin* dari membran kerabang telur ayam ras dan ayam buras telah berhasil dilakukan dengan menggunakan metode *ion exchange chromatography*. Hasil elusi yang terbaik untuk mengambil *ovotransferrin* ini adalah dengan menggunakan elusi 0,1 mM NaCl. Hasil elusi ini telah berhasil untuk menghilangkan protein lain selain *ovotransferrin*. Berdasarkan perhitungan jumlah protein, maka didapatkan hasil bahwa sebutir ayam ras dengan berat 60 gram/butir dan buras dengan berat 45 gram/butir, terkandung *ovotransferrin* dalam membran kerabang telur masing-masing sebesar  $0,75 \pm 0,11$  dan  $0,16 \pm 0,05\%$ . Keberhasilan purifikasi *ovotransferrin* dari membran kerabang telur diharapkan dapat membuka peluang pemanfaatan *ovotransferrin* membran kerabang telur untuk berbagai keperluan, misalnya sebagai senyawa antibakteri yang aman untuk pangan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abeyrathne ED, Lee HY Ahn DU. 2014. Separation of ovotransferrin and ovomucoid from chicken egg white. *Poultry Sci* 93: 1010-1017. DOI: 10.3382/ps.2013-03649.
- Al-Baarri AN, Ogawa M, Hayakawa S. 2010. Scale-up studies on immobilization of lactoperoxidase using milk whey for producing antimicrobial agent. *J Indonesian Trop Anim Agric* 35: 185-191. DOI: 10.14710/jitaa.35.3. 185-191.
- Ayadi MA, Khemakhem M, Belgith H, Attia H. 2008. Effect of moderate spray drying conditions on functionality of dried egg white and whole egg. *J Food Sci* 73: E281-E287. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00811.x.
- Balaz M. 2014. Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications materials science. *Acta Biomater* 10: 3827-3843. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.020.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7: 248-254.
- Charter EA, Lagarde G. 2014. Natural antimicrobial systems: lysozyme and other protein in egg. Dalam: Batt Carl A and Tortorello Mary Lou (ed). *Encyclopedia of Food Microbiology* (2<sup>nd</sup> Edition). 936-940. Academic Press is an Imprint of Elsevier, United Kingdom.
- Fahardian A, Jinap S, Faridah A, Zaidul ISM. 2012. Effects of marinating on the forming of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene benzo[b]fluorathene dan fluranthene) in grilled beef meat. *Food Control* 28: 420-425. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.04.034.
- Hinckea MT, Gautronb J, Panheleux M, Garcia-Ruizc M, McKee MD, Nys Y. 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology* 19: 443-453. DOI: 10.1016/S0945-053X(00)00095-0.
- Ibrahim HR. 2000. Ovotransferrin. Dalam Naidu AS. Ed, *Natural Food Antimicrobial Systems*. 211-226. CRC Press, Inc, New York.
- Kamkum P, Atiwongsangthong N, Muanghlua R, Vittayakorn N. 2015. Application of chicken eggshell waste as a starting material for synthesizing calcium niobate ( $\text{Ca}_4\text{Nb}_2\text{O}_9$ ) powder. *Ceram Int* 41: 69-75. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.03.189.
- Ketaren PP. 2010. Kebutuhan gizi ternak unggas di Indonesia. *Wartazoa* 20: 172-180.
- Ko KY, Mendonca AF, Ahn DU. 2008. Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poultry Sci* 87: 1649-1658. DOI: 10.3382/ps.2007-00521.
- Ko KY, Ahn DU. 2008. An economic and simple purification procedure for the large scale production of ovotransferrin from egg white. *Poultry Sci* 87: 1441-1450. DOI: 10.3382/ps.2007-00434.
- Mahasri G, Fajriah U, Subekti S. 2010. Karakterisasi protein *Lernaea cyprinacea* dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. *J Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 2: 61-66.
- Naknukool S, Hayakawa S, Uno T, Ogawa M. 2009. Antimicrobial Activity of Duck Egg Lysozyme Against *Salmonella enteritidis*. Dalam: Canovas GB, Mortimer A, Lineback D, Spiess, W, Buckle K, Colonna P. *Global Issues in Food Science and Technology*. 293-307. Academic Press is an imprint of Elsevier, United Kingdom. DOI: 10.1051/IUFoST:200060308.
- Ruff KJ, DeVore DP, Leu MD, Robinson MA. 2009. Eggshell membrane: a possible new natural therapeutic for joint and connective tissue disorders. Results from two open-label human clinical studies. *Clin Intervention Aging* 4: 235-240.

- Stadelman WJ. 2000. Eggs and Egg Products. Dalam: Wiley J, Sons, Francis FJ. (Ed.), Encyclopedia of Food Science and Technology (2<sup>nd</sup> Edition). 36–54. New York.
- Soekarto S. 2013. Teknologi Penanganan dan Pengolahan Telur. 136–138. Alfabeta, Bandung.
- Urip S. 2007. Pengaruh penambahan ekstrak dan katuk terhadap kualitas telur dan berat organ dalam. J Sain Peternakan Indonesia 2: 5–10.
- Touch V, Hayakawa S, Yamada S, Kaneko S. 2004. Effects of a lactoperoxidase–thiocyanate–hydrogen peroxide system on Salmonella enteritidis in animal or vegetable foods. Int J Food Microbiol 93: 175–183. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.11.004.
- Varon O, Allen KJ, Bennett DC, Mesak LR, Scaman CH. 2013. Purification and characterization of tinamou egg white ovotransferrin as an antimicrobial agent against foodborne pathogenic bacteria. Food Res Int 54: 1836-1842. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.02.041.
- Wu J, Acero-Lopez A. 2012. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation. Food Res Int 46: 480–487. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.012.