

Lisozim dari Putih Telur Ayam sebagai Agen Antibakterial (Lysozyme from Chicken Egg White as an Antibacterial Agent)

Syahrizal Nasution¹, E Kusumaningtyas², DN Faridah³ dan HD Kusumaningrum³

¹Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana
Institut Pertanian Bogor, Jl Darmaga PO Box 220 Bogor, 16002
²Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl RE Martadinata No. 30, Bogor 16114
³Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Pertanian Bogor, Jl Darmaga PO Box 220 Bogor, 16002
harsikusumaningrum@yahoo.com

(Diterima 10 September 2018 – Direvisi 8 November 2018 – Disetujui 23 November 2018)

ABSTRACT

Lysozyme is one of the constituent proteins of chicken egg white that plays an important role in a protection system during the embryo growing process. Lysozyme protection systems can be applied in food and for health. This paper aims to describe the role of egg white lysozyme which has the antibacterial activity to improve food safety and health. Mechanism and activity of lysozyme protection can be explored by understanding the structure of proteins, type of amino acids, and the sequence of amino acids. The mechanism of lysozyme antibacterial activity against Gram positive bacteria occurs through its ability to breakdown the peptidoglycan glycosidic bonds in the bacterial cell wall membrane. The antibacterial activity of lysozyme can be increased when its normal lysozyme form was denatured/hydrolyzed through modifying the lysozyme structure by heat and enzymatic treatment. Heat treatment will reveal the active site of lysozyme after denaturation, leading to the destruction of the bacterial cell wall membrane. Enzymatic treatment through hydrolysis process of hydrolysis by protease enzymes will generate antibacterial peptides, which have the ability to inhibit the growth of Gram positive bacteria and Gram negative bacteria. Antibacterial lysozyme peptides and heat treated lysozyme are dominated by hydrophobic amino acids and positively charged to facilitate interaction between lysozyme and lipopolysaccharide which coats peptidoglycan. Antibacterial lysozyme peptide can be used as an antibiotic and a safe natural preservative compared to synthetic material and can reduce the risk of destructive bacteria and pathogenic bacteria. Lysozyme peptide is potential to protect human health since it has also other activities such as inhibition of angiotensin-converting enzyme, antihypertensive, antitumor, antioxidant, and antiviral agents.

Key words: Lysozyme, egg white, chicken, peptide, antibacterial

ABSTRAK

Lisozim merupakan salah satu protein penyusun komponen putih telur ayam yang berperan penting sebagai sistem proteksi selama proses pertumbuhan embrio. Sistem proteksi lisozim dapat diaplikasikan dalam bidang pangan dan kesehatan. Makalah ini bertujuan menguraikan peran lisozim dari putih telur yang memiliki aktivitas antibakteri dalam meningkatkan keamanan pangan dan kesehatan. Mekanisme dan aktivitas sistem proteksi lisozim dapat dipelajari dengan memahami struktur protein, jenis asam amino dan urutan asam aminonya. Mekanisme aktivitas antibakteri lisozim terhadap bakteri Gram positif terjadi melalui kemampuannya memutus ikatan glikosidik peptidoglikan pada membran dinding sel bakteri. Aktivitas antibakteri lisozim dapat ditingkatkan ketika bentuk lisozim normal didenaturasi/dihidrolisis melalui modifikasi struktur lisozim dengan perlakuan panas dan enzimatis. Perlakuan panas memunculkan sisi aktif lisozim setelah denaturasi sehingga memicu perusakan membran dinding sel bakteri. Perlakuan enzimatis melalui proses hidrolisis oleh enzim protease menghasilkan peptida-peptida antibakteri yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Peptida antibakteri lisozim dan lisozim hasil perlakuan panas didominasi oleh asam amino hidrofobik dan bermuatan positif yang memudahkan interaksi antara lisozim dan lipopolisakarida yang melapisi peptidoglikan. Peptida antibakteri lisozim dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik dan pengawet alami yang aman dibandingkan dengan bahan sintesis serta dapat menurunkan risiko bakteri perusak dan bakteri patogen. Peptida lisozim juga berpotensi menjaga kesehatan manusia karena memiliki aktivitas lainnya seperti penghambatan *angiotensin-converting enzyme*, antihipertensi, antitumor, antioksidan dan antivirus.

Kata kunci: Lisozim, putih telur, ayam, peptida, antibakteri

PENDAHULUAN

Telur ayam merupakan produk peternakan yang banyak digunakan dalam bidang pangan. Telur ayam

memiliki rasa yang enak dan disukai, gizi yang lengkap seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral dan vitamin, serta karakter fungsional (emulsifikasi, *gelling* dan *foaming*) yang penting dalam produk pangan

(Soekarto 2013). Penggunaan telur dalam bidang pangan didukung oleh produksi telur ayam yang tinggi dan tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia dengan harga relatif murah dan dapat dijangkau semua masyarakat sebagai sumber protein (PDSIP 2017).

Telur ayam dapat digunakan sebagai bahan utama pangan atau sebagai lauk pauk menggunakan seluruh isi telur seperti telur asin, telur pindang dan telur dadar. Telur ayam dapat juga dipakai sebagai bahan tambahan dalam pembuatan produk di industri pangan seperti produk roti, *cake* dan *bakery* (Susanto 2012). Industri pangan biasanya hanya menggunakan bagian kuning telur, sedangkan putih telur yang masih mengandung komponen bioaktif tidak dipakai (Huopalahti et al. 2007) sehingga dapat dimanfaatkan menjadi produk lain seperti produk kosmetik (*masker*).

Lisozim (*lysozyme*) merupakan salah satu protein putih telur (Gyawali & Ibrahim 2014) yang bermanfaat dan dapat dipisahkan, salah satunya menggunakan metode *chromatography* (Carrillo et al. 2016). Lisozim dari putih telur berjumlah sekitar 3,5% (Lesnierowski & Stangierski 2018). Lisozim dapat digunakan sebagai pengawet dan antibakteri alami yang bersifat aman (Carrillo et al. 2016) pada berbagai produk pangan (Herath et al. 2015; Asmaa et al. 2017; Valdes et al. 2017). Aktivitas antibakteri lisozim berguna untuk mencegah kerusakan pangan dari bakteri perusak (Lesnierowski et al. 2001) dan mencegah tumbuhnya bakteri patogen (Rawdkuen et al. 2012; Cegielska-Radziejewska & Tomasz 2014; Wulandari et al. 2015).

Aktivitas antibakteri lisozim normal lebih aktif terhadap bakteri Gram positif melalui mekanisme perusakan peptidoglikan pada membran dinding sel (Callewaert et al. 2012; Susanto et al. 2013) sehingga masih perlu dicari alternatif agar lisozim tetap dapat bekerja efektif terhadap kemungkinan kontaminasi dari selain bakteri Gram positif. Penggunaan lisozim normal dengan penambahan bahan lain sebagai alternatif untuk menghasilkan sinergisitas dalam menghambat atau membunuh bakteri-bakteri dalam pangan masih kurang efisien (Rao et al. 2008; Ko et al. 2009; Herath et al. 2015). Modifikasi lisozim perlu dilakukan sebagai alternatif yaitu dengan perlakuan kimia, termokimia, ultrafiltrasi dan teknologi lainnya (Cegielska-Radziejewska et al. 2009a; 2010; Lesnierowski 2009; Lesnierowski et al. 2009; Tribst et al. 2017).

Alternatif sederhana lain yang dapat dilakukan untuk meningkatkan aktivitas antibakteri lisozim yaitu melalui perlakuan panas dan enzimatis (Aminlari et al. 2014). Perlakuan ini lebih aman dibandingkan dengan modifikasi secara tidak alami (Gonzalez et al. 2010; Alhazmi et al. 2014). Oleh karena itu, perlu pemahaman terkait struktur protein, komponen asam amino, serta urutannya sehingga dapat diperoleh

perlakuan yang menghasilkan aktivitas antibakteri lisozim yang sesuai.

Lisozim juga digunakan dalam bidang farmasi dan pakan ternak, selain dalam bidang pangan. Putih telur banyak dipilih sebagai sumber lisozim oleh industri karena menghasilkan jumlah paling banyak dan lebih mudah ditangani untuk tujuan aplikasi dibandingkan dengan sumber lainnya. Lisozim sebagai pengawet pangan dapat diaplikasikan secara langsung, dikombinasi dengan antimikroba lain, maupun ditambahkan dalam kemasan *edibel* (Mangalassary et al. 2008; Wulandari et al. 2015; Valdes et al. 2017) seperti pada keju (Sinigagli et al. 2008), sayuran, daging (Cannarsi et al. 2008; Radziejewska & Szablewski 2013), ikan dan susu. Makalah ini bertujuan untuk menguraikan peran lisozim putih telur sebagai antibakteri dan manfaatnya untuk meningkatkan keamanan pangan dan kesehatan.

KOMPONEN BIOAKTIF PUTIH TELUR

Telur atau ovum pada dasarnya memiliki fungsi sebagai alat reproduksi. Berbeda dengan ovum mamalia yang berukuran sangat kecil, telur ayam berukuran besar dan dilapisi oleh kulit telur yang cukup kuat sebagai pelindung isi telur (Lesnierowski & Stangierski 2018). Selain itu, bagian kuning dan embrio sebagai isi telur yang fertil juga dilapisi oleh putih telur yang berfungsi sebagai pelindung. Fungsi putih telur sebagai pelindung dapat dimanfaatkan karena mengandung protein-protein yang memiliki aktivitas biologis (Lesnierowski & Stangierski 2018) dan dapat menghasilkan peptida-peptida bioaktif hasil hidrolisis (Eckert et al. 2013).

Komponen protein penyusun putih telur dapat dibedakan berdasarkan berat molekul dan titik isoelektriknya (Tabel 1). Komponen protein penyusun putih telur memiliki perbedaan urutan dan komposisi asam amino sehingga menghasilkan protein yang memiliki muatan dan hidrofobisitas yang berbeda serta mempengaruhi aktivitas biologis dan antimikrobanya (Huopalahti et al. 2007). Aktivitas antimikroba yang dimiliki putih telur berkaitan dengan fungsinya sebagai pelindung embrio. Berdasarkan fungsi tersebut, putih telur dapat dijadikan sebagai agen antibakteri yang dapat dimanfaatkan pada berbagai bidang seperti kesehatan, pangan, pakan, farmasi dan kosmetik (Abeyrathne et al. 2013a; Lesnierowski & Stangierski 2018).

Ovalbumin merupakan *phosphoglycoprotein* yang jumlahnya mencapai 61,6% dari protein putih telur dengan berat molekul 45 kD, titik isoelektrik 4,5 dan tersusun dari 385 asam amino. *Ovalbumin* adalah protein terbanyak putih telur. Protein terbanyak kedua

Tabel 1. Protein penyusun putih telur

| Nama protein | Beral molekul (kDa)* | Komposisi (% protein putih telur)* | Fungsi | Sumber |
|----------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Ovalbumin</i> | 45,0 | 61,60 | <i>Serine proteinase inhibitor</i> | Lechevalier et al. (2007) |
| <i>Ovotransferin</i> | 76,0 | 14,30 | Fortifikasi besi pada pangan | Superti et al. (2007) |
| <i>Ovomucoid</i> | 28,0 | 12,60 | <i>Protease inhibitor</i> | Rehault (2007) |
| <i>Ovomucin</i> | 210,0 | 4,00 | Agen pembentukan gel | Hiidenhovi (2007) |
| <i>Lysozyme</i> | 14,3 | 3,50-3,90 | Antibakteri dan pengawet pangan | |
| <i>Ovoinhibitor</i> | 49,0 | 1,70 | <i>Serine protease inhibitor</i> | Rehault (2007) |
| <i>Ovostatin</i> | 780,0 | 0,50 | <i>Antiprotease, serine protease dan aspartyl protease</i> | Rehault (2007) |
| <i>Avidin</i> | 68,3 | 0,06 | Teknologi biotin-avidin | Nau et al. (2007) |
| <i>Cystatin</i> | 12,7 | 0,05 | <i>Antiprotease</i> | Rehault (2007) |

Sumber: *Lesnierowski & Stangierski (2018)

yaitu *ovotransferin* yang berjumlah sekitar 14,3% protein putih telur. *Ovotransferin* berfungsi dalam mentransfer ion besi dari saluran ovidak pada embrio telur. *Ovotransferin* memiliki aktivitas antimikroba, antivirus dan antioksidan (Superti et al. 2007).

Protein putih telur dengan jumlah terbanyak ketiga dan keempat adalah *ovomucoid* dan *ovomucin*. *Ovomucoid* berjumlah 12,6% dengan berat molekul 28 kD dan titik isoelektrik 4,1. Protein *ovomucoid* berbeda dengan *ovomucin*. *Ovomucin* dikenal sebagai agen pembentukan gel yang berjumlah mencapai 4% dari protein putih telur. *Ovomucin* merupakan *glycoprotein* yang memiliki berat molekul 0,21 kD dan titik isoelektrik sekitar 4,5 serta terdiri dari 2087 asam amino. *Ovomucin* diteliti memiliki aktivitas antitumor terhadap sel tumor, aktivitas antivirus terhadap berbagai virus (*influenza, bovine rotavirus, newcatle disease virus*), aktivitas immunopotentiator dan aktivitas antibakteri (Hiidenhovi 2007).

Protein lisozim akan banyak diulas dalam tulisan ini. Lisozim berjumlah 3,5% dari protein putih telur dengan berat molekul 14,3 kD dan titik isoelektrik 10,7. Lisozim memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan dapat diaplikasikan sebagai pengawet dalam bidang pangan (Silveti et al. 2017). Selain itu, lisozim memiliki aktivitas lain seperti antihipertensi, antioksidan dan penghambat *angiotensin-converting enzyme* (Lesnierowski & Kijowski 2007).

Protein *ovoinhibitor* memiliki aktivitas *serine protease inhibitor* terhadap *trypsin, chymotrypsin* dan *elastase* (Rehault 2007). *Ovostatin* merupakan *macroglobulin* dengan aktivitas sebagai antiprotease pada *metalloprotease* seperti *stromelysin collagenase* dan *thermolysin*; *serine protease* seperti *chymotrypsin, trypsin* dan *neutrophil elastase*; *cysteine proteases* seperti *papain*; serta *aspartyl protease* seperti *pepsin*

dan *renin* (Rehault 2007). Protein dengan jumlah terendah adalah *avidin* dan *cystatin*. Protein *avidin* dimanfaatkan pada teknologi biotin-avidin dalam bidang biokimia (Nau et al. 2007), sedangkan *cystatin* memiliki aktivitas antiprotease (Rehault 2007).

PENGUNAAN LISOZIM DAN PEPTIDA LISOZIM SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERIAL

Resistensi bakteri terhadap bahan sintesis menjadi alasan perlu dicarinya alternatif baru antibakteri alami dalam bidang pangan dan kesehatan. Bahan sintesis antibakteri seperti bahan pengawet pangan sintesis harus dihindari karena berbahaya bagi kesehatan tubuh (Lucera et al. 2012). Lisozim dan peptida lisozim sebagai antibakteri alami dapat digunakan sebagai pengganti pengawet pangan sintesis misalnya pengganti pengawet nitrat atau nitrit pada produk sosis (Herath et al. 2015). Peptida lisozim dan hasil modifikasi dapat digunakan tanpa penambahan bahan sintesis lain sebagai antibakteri untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada pangan karena aktivitas antibakteri peptida lisozim meningkat pada bakteri Gram positif dan Gram negatif dibandingkan dengan lisozim normal yang hanya pada bakteri Gram positif.

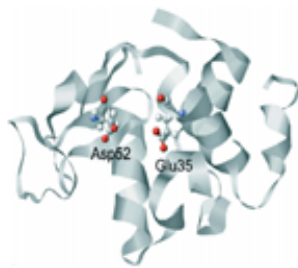
Peptida lisozim sebagai antibiotik juga dapat digunakan dalam mengatasi masalah resistensi bakteri terhadap antibiotik sintesis. Peptida lisozim dapat diperoleh secara alami melalui hidrolisis enzim seperti *pepsin, tripsin* dan *papain*. Peptida sebagai antibiotik memiliki kelebihan yaitu lebih mudah didegradasi oleh tubuh sehingga kontaminasi dan akumulasi pada tubuh dapat dikurangi (Kusumaningtyas 2018). Mudahnya degradasi peptida oleh tubuh dapat menurunkan risiko bahaya pada manusia dan residu antibiotik sintesis pada produk pangan hasil hewan ternak. Walaupun demikian, peptida sebagai antibiotik juga dapat

diperoleh dari putih telur yang jumlahnya melimpah. Penggunaan peptida diharapkan dapat berguna sebagai antibiotik untuk keperluan manusia maupun hewan ternak.

MEKANISME LISOZIM SEBAGAI ANTIBAKTERIAL

Lisozim pertama kali ditemukan oleh Alexander Fleming. Lisozim (E.C.3.2.17, 1,4- β -N-acetyl-muramic-hydrolase) disekresikan oleh *polymophonuclear leukosit* (Ibrahim et al. 2005). Lisozim tergolong enzim bakteriolitik yang merupakan enzim hidrolase dan dikenal sebagai *muramidase* atau *N-acetylmuramoyl-hydrolase* (Dekina et al. 2015). Lisozim termasuk kelompok *ovo-antimicrobial* asal hewan yang berdasarkan sumber hewannya dibagi menjadi tiga tipe yaitu tipe C (tipe konvensional atau ayam), tipe G (tipe angsa) dan tipe I (tipe invertebrata) (Callewaert & Michiels 2010).

Lisozim ditemukan sebagai rantai polipeptida tunggal yang terdiri dari 129 asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida kovalen. Lisozim memiliki asam amino ujung N berupa lisin dengan gugus amin bebas serta asam amino ujung C berupa leusin dengan gugus karboksil bebas. Molekul lisozim memiliki empat jembatan disulfida (S-S) bersama dengan enam bagian *helix* yang menjaga stabilitas lisozim terhadap panas. Molekul lisozim merupakan molekul kompleks yang tersusun padat dan memiliki bentuk yang menyerupai *ellipsoid* dengan dimensi 4,5 \times 3,0 \times 3,0 nm (Cegielska-Radziejewska et al. 2008). Sisi aktif pada struktur lisozim yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu asam glutamat 35 (Glu₃₅) dan asam aspartat (Asp₅₂) (Gambar 1).

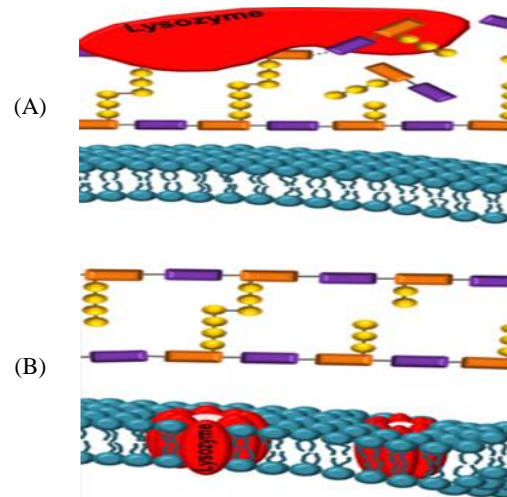


Gambar 1. Sisi aktif lisozim

Sumber: Held & Smaalen (2014)

Aktivitas antibakteri lisozim terhadap bakteri Gram positif terjadi melalui hidrolisis ikatan glikosidik β 1-4 karbon homopolimer *N-acetylglucosamine* (NAG) dan karbon heteropolimer *N-acetylmuramic acid* (NAM) dari peptidoglikan pada dinding sel bakteri yang diilustrasikan pada Gambar 2A (Susanto et al. 2012). Aktivitas lisozim lebih aktif pada bakteri

Gram positif dibandingkan pada bakteri Gram negatif karena Gram negatif memiliki komponen membran luar seperti lipopolisakarda sebagai perlindungan (Wulandari et al. 2015) serta komponen membran dalam sel bakteri yang terdiri dari lapisan-lapisan sehingga lebih sulit dirusak (Lesnierowski et al. 2001). Gambar 2B memperlihatkan mekanisme penyisipan lisozim melalui membran sehingga terbentuk lubang.



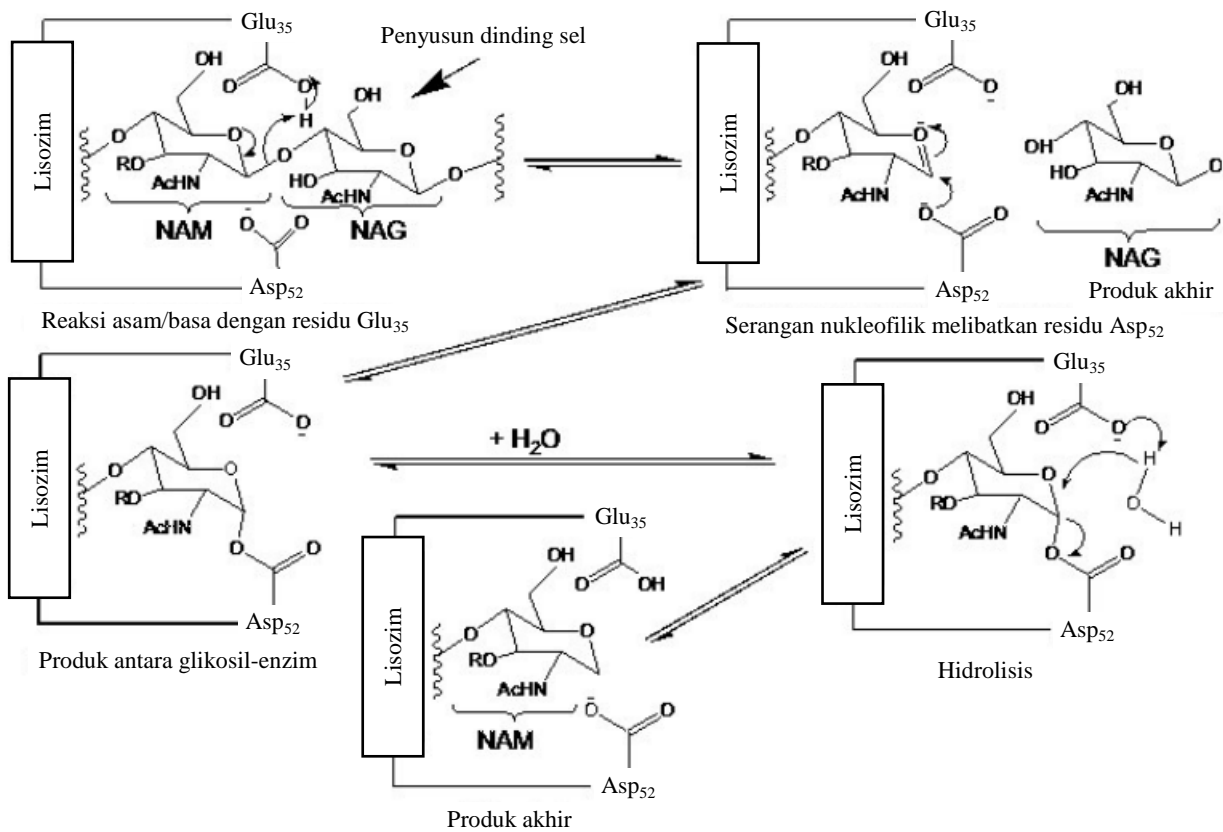
(A) Pemutusan ikatan glikosidik; (B) Penyisipan lisozim pada membran

Gambar 2. Aksi lisozim pada membran bakteri

Sumber: Stephanie & Alson (2017)

Mekanisme pemotongan ikatan glikosidik dinding sel bakteri dijelaskan berdasarkan reaksi mekanisme Philips yang melibatkan residu Glu₃₅ dan Asp₅₂ sebagai sisi aktif (Gambar 3). Proton terminal Glu₃₅ ditransfer ke atom O dari ikatan glikosidik diantara NAG dan NAM yang memicu pemutusan ikatan glikosidik dan pembentukan ion carbonium. Muatan positif dari ion carbonium akan stabil karena muatan negatif dari Asp₅₂ selama ion hidroksil terikat pada atom C positif dan terjadi reprotonisasi. Strynadka & James (1991) menjelaskan bahwa pada mekanisme Philips, daerah Glu₃₅ dan Asp₅₂ yang dibangun oleh ikatan hidrogen memicu katalis ikatan glikosidik. Muatan negatif Asp₅₂ dibutuhkan untuk terjadinya reaksi enzimatik yang menstabilisasi pembentukan ion carbonium setelah ikatan glikosidik putus (Held & Smaalen 2014). Reaksi ini melibatkan *glycosyl-enzyme intermediate* yang substratnya secara kovalen terikat oleh Asp₅₂ sehingga mekanisme katalis lisozim melibatkan kompleks *intermediate* yang di salah satu cincin karbonnya terikat secara kovalen oleh Asp₅₂ (Callewaert & Michiels 2012).

Aktivitas antibakteri lisozim pada bakteri dapat dipengaruhi oleh perbedaan penyusun membran dinding sel bakteri (Joao et al. 2016). Komponen



Gambar 3. Mekanisme aksi lisozim pada substrat peptidoglikan

Sumber: Benkerroum (2008)

penyusun dinding sel bakteri Gram positif mengandung sekitar 40-90% peptidoglikan sedangkan Gram negatif hanya mengandung 10% (Islam et al. 2006) dan dilapisi oleh lipopolisakarida. Aktivitas antibakteri lisozim putih telur juga akan dipengaruhi oleh faktor lain seperti sistem manajemen ayam petelur, modifikasi pakan yang diberikan, penyimpanan telur dan genetik induk. Faktor-faktor tersebut menunjukkan bahwa sumber lisozim dan penanganan telur yang berbeda akan menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda.

ISOLASI LISOZIM ASAL PUTIH TELUR AYAM

Isolasi lisozim putih telur dapat dilakukan dengan berbagai metode. Metode isolasi lisozim yang berkembang hingga saat ini meliputi metode presipitasi, *aqueous two-phase*, kromatografi penukar kation, kromatografi afinitas, ultrafiltrasi serta kombinasi (Chiu et al. 2012; Kose & Denizli 2013; Brand et al. 2016; Mol et al. 2017; Shahmohammad 2017; Carrillo et al. 2018). Lisozim pertama kali diisolasi dengan amonium sulfat namun karakter lisozim yang dihasilkan masih berubah berdasarkan pH dan garam (Hamzah et al. 2014; 2015). Metode yang

paling banyak digunakan adalah kromatografi penukar kation menggunakan resin dengan prinsip perbedaan muatan karena lisozim memiliki titik isoelektrik (pI) yang lebih tinggi. Resin *carboxyl methyl cellulose* (CMC) dalam kromatografi kolom pertama kali digunakan untuk mengisolasi lisozim namun ukurannya kecil, sulit digunakan dan memiliki laju yang rendah. Isolasi *magnetic cation exchange* (Safarik et al. 2007) dapat digunakan memakai reduktan seperti β -mercaptoethanol dan ultrafiltrasi tetapi metode ini tidak bisa untuk menghasilkan jumlah lisozim yang banyak dan β -mercaptoethanol tidak dapat digunakan dalam pangan.

Jumlah dan kemurnian lisozim yang dihasilkan telur ayam akan dipengaruhi oleh metode dan berat protein putih telur yang dipakai. Berat protein awal putih telur yang lebih tinggi akan menghasilkan jumlah lisozim yang lebih banyak. Selain itu, resin penukar kation dan larutan buffer untuk elusi lisozim dari kolom dalam metode isolasi lisozim juga akan mempengaruhi jumlah dan kemurnian lisozim yang diperoleh (Wulandari 2018). Metode isolasi tersebut dapat dibedakan menjadi metode analitik dan metode preparatif. Metode preparatif akan menghasilkan jumlah dan kemurnian lisozim yang lebih tinggi. Selain

itu, metode isolasi dapat dilakukan dengan proses *batch* secara langsung maupun proses *continuous* atau dengan kolom. Proses *batch* lebih baik untuk isolasi lisozim untuk tujuan aplikasi karena jumlah yang dihasilkan lebih banyak (Abeyrathne et al. 2013b).

Resin yang dapat digunakan dalam metode kromatografi penukar kation dapat berupa CMC, CM-toyopearl 650M dan resin *amberlite* FPC 3500 (Abeyrathne et al. 2014). Wulandari (2018) melaporkan bahwa resin *amberlite* FPC 3500 mampu mengikat lisozim lebih kuat dibandingkan dengan CMC karena gugus karboksil resin *amberlite* bersifat lebih asam. Stabilitas resin *amberlite* pada pH basa lebih tinggi dibandingkan dengan CMC. Resin *amberlite* pada pH basa memungkinkan seluruh gugus karboksilnya terionisasi dan berikatan secara kuat dengan molekul lain yang berlawanan muatan. Nilai pH 9,3 yang digunakan sebagai pH optimum (pH putih telur normal) akan mempengaruhi resin yang mengakibatkan gugus karboksil mengalami deprotonasi sehingga mengakibatkan resin bermuatan negatif. Selain pH optimum resin, pH sebesar 9,3 dipilih karena resin harus memiliki nilai lebih rendah 1-2 poin di bawah titik isoelektrik lisozim. Lisozim dalam kondisi ini bermuatan positif karena titik isoelektriknya 10,7. Perbedaan muatan tersebut menyebabkan lisozim akan terikat resin secara ionik. Hasil lisozim yang dihasilkan menggunakan metode preparatif dengan resin *amberlite* mencapai 69% dan kemurnian mencapai 68,62%. Berdasarkan Abeyrathne et al. (2013a), lisozim yang diperoleh dengan resin *amberlite* lebih dari 97,7% dengan kemurnian lebih dari 97%. Hasil dan kemurnian yang lebih tinggi dapat dipengaruhi oleh larutan buffer saat elusi yang tidak melepas lisozim dari resin karena lisozim dapat juga terikat secara fisik.

Resin *amberlite* aman dan cocok digunakan untuk keperluan manusia karena tidak ada penambahan bahan kimia sehingga tidak menyebabkan perubahan fisik dan kimia. Resin *amberlite* lebih baik dibandingkan dengan CMC karena hanya sedikit lisozim yang terikat oleh resin CMC dan masih tersisa pada putih telur. Selain itu, CMC memiliki ukuran yang kecil (diameter 25-60 µl) sehingga akan terbawa cairan elusi dan hilang bersama resin saat pencucian. CMC akan sulit digunakan pada proses *batch* dan memiliki laju lambat pada proses dengan kolom. Resin *amberlite* memiliki ukuran yang lebih besar (diameter 0,3-1,18 mm) sehingga lebih mudah digunakan dan memiliki kapasitas *ion exchange* yang lebih besar (>2,6 mEq/ml) sedangkan kapasitas CMC hanya 1,0 mEq/ml. Resin lain seperti CM-Toyopearl 650M juga memiliki ukuran kecil dan kapasitas *ion exchange* yang lebih kecil (0,24 mEq/ml). Resin *amberlite* selain mudah, cepat dan lebih murah, resin ini mampu menghasilkan kemurnian dan jumlah yang lebih tinggi sehingga dapat digunakan untuk

sekala yang besar sedangkan CMC lebih mahal dan kurang efisien (Abeyrathne et al. 2014).

Pemurnian lisozim dapat dilakukan dengan prinsip kromatografi penukar kation (Tankrathok et al. 2009) karena lisozim memiliki pI 10,7 yang berbeda dengan protein putih telur lainnya (<6,5), hanya avidin yang memiliki pI (10,0) yang mendekati lisozim sehingga secara prinsip untuk memurnikannya dapat dilakukan pada pH 10. Seluruh protein putih telur pada pH ini akan bermuatan negatif kecuali protein lisozim dan avidin karena memiliki pI yang lebih tinggi dibandingkan dengan pH lingkungan. Lisozim akan bermuatan positif karena memiliki pI yang lebih tinggi dibandingkan dengan pH lingkungan, sedangkan avidin bermuatan netral karena memiliki pI yang sama dengan pH lingkungan (Wulandari 2018). Resin akan memiliki pH yang lebih rendah dari pH lingkungan sehingga akan bermuatan negatif dan menyebabkan partikel resin akan mengikat lisozim. Lisozim diperoleh dengan cara mengelusi lisozim yang terikat pada resin dengan larutan buffer sehingga diperoleh lisozim murni.

PEPTIDA LISOZIM HASIL HIDROLISIS MENGUNAKAN ENZIM PROTEASE DAN MEKANISME AKTIVITAS ANTIBAKTERINYA

Beberapa penelitian memperlihatkan proses hidrolisis lisozim oleh beberapa enzim protease menghasilkan hidrolisat berupa peptida-peptida bioaktif sebagai antibakteri (Shahidi & Zhong 2008; Thammasirirak et al. 2010; Asodeh et al. 2012). Hasil hidrolisis lisozim putih telur secara enzimatis dilaporkan menghasilkan peptida dengan berat molekul $1753,98 \pm 0,5$ Da yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif *Escherichia coli* dan bakteri Gram positif *Leuconostoc mesenteroides* dengan MIC sebesar $355,64 \pm 2,2$ µg/ml dan $442,25 \pm 2,8$ µg/ml secara berurutan (Memarpoor-Yazdi et al. 2012). Penelitian Abdou et al. (2007) menunjukkan bahwa hasil hidrolisis lisozim dengan enzim pepsin menghasilkan peptida dengan aktivitas antibakteri terhadap sel vegetatif dan spora spesies *Bacillus*.

Penelitian hidrolisis lisozim untuk menghasilkan peptida bioaktif sebagai antibakteri kebanyakan menggunakan enzim asal hewan berupa pepsin (Mine et al. 2004; Ibrahim et al. 2005; Abdou et al. 2007; Carrillo et al. 2014; Carrillo & Ramos 2018). Enzim protease asal bakteri belum digunakan pada penelitian tersebut sedangkan enzim protease asal hewan dan asal tumbuhan sudah digunakan. Hal ini berbeda dengan penelitian peptida antibakteri pada susu di Indonesia yang menggunakan enzim asal tumbuhan dan asal bakteri yaitu *Bacillus thuringiensis protease*, bromelain (Kusumaningtyas, et al. 2015a; 2015b; 2016a; 2016b) serta papain (Lestari & Soesilo 2017).

Penelitian-penelitian lain menunjukkan bahwa hasil hidrolisis lisozim dengan clostripain (Pellegrini et al. 1997), tripsin dan papain (Memarpoor-Yazdi et al. 2012) dapat menghasilkan peptida bioaktif antibakteri dengan aktivitas yang berbeda. Perbedaan aktivitas antibakteri terjadi karena perbedaan komponen asam amino peptida. Komponen asam amino yang berpengaruh terhadap aktivitas peptida antibakteri dari lisozim berupa asam amino lisin, arginin, triptofan dan tirosin (Carrillo & Ramos 2018). Peptida yang dihasilkan secara enzimatik ini akan lebih aman dibandingkan dengan peptida yang diproduksi secara sintesis (Almsned 2017; Kusumaningtyas 2018). Adapun beberapa penelitian peptida antibakteri lisozim hasil perlakuan enzimatik dapat dilihat pada Tabel 2.

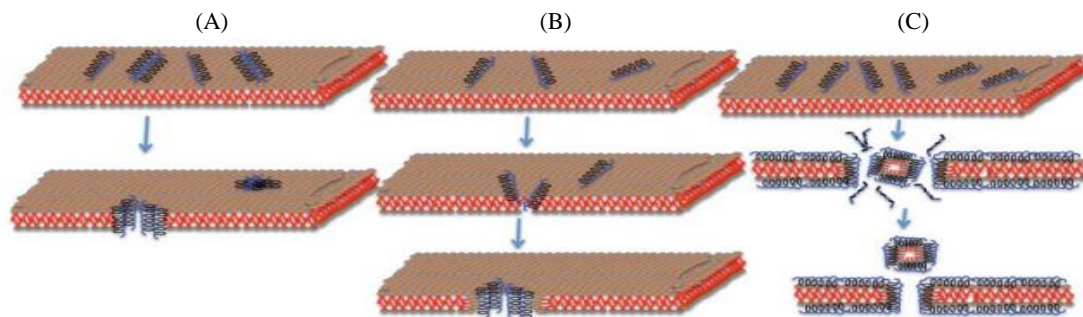
Khursid et al. (2016) menjelaskan kemungkinan aktivitas antibakteri peptida dapat terjadi melalui tiga model yaitu model *barrel-stave*, model *toroidal* dan model *carpet* (Gambar 4). Mekanisme aktivitas antibakteri dari peptida-peptida lisozim antibakteri berbeda-beda sesuai dengan susunan, muatan, polaritas dan berat molekul asam aminonya. Mekanisme antibakteri tersebut juga dapat terjadi melalui perusakan membran, penghambatan sintesis biopolimer ekstraseluler dan perusakan fungsi intraseluler bakteri (Andersson et al. 2016; Khursid et al. 2016; Lee et al. 2016; Lohner & Hilpert 2016).

Carrillo et al. (2018) menyebutkan bentuk *amphiphilic* dan muatan positif dari peptida lisozim memicu interaksi peptida dengan permukaan membran dan kemudian menyebabkan membran bakteri Gram positif berlubang. Peptida bermuatan positif dapat menghambat bakteri Gram negatif melalui interaksi antara lipopolisakarida dan elektrostatis dengan muatan negatif lipid membran bakteri yang memicu kerusakan. Carrillo & Ramos (2018) menambahkan mekanisme antibakteri peptida lisozim semakin tinggi apabila peptida didominasi asam amino bermuatan positif, hidrofobik dan *amphiphilic helical*.

MODIFIKASI AKTIVITAS ANTIBAKTERI LISOZIM DENGAN PERLAKUAN PANAS

Lisozim di alam ditemukan sebagai monomer dan dimer yang reversibel, namun diketahui bentuk dimer dan polimer lebih aktif. Bentuk lisozim tersebut dapat dipengaruhi oleh pH, konsentrasi dan suhu yang tergantung fase transisi molekuler. Lisozim ditemukan dalam dua bentuk konformasi diantara suhu 20-30°C, dengan titik transisi pada suhu 25°C dan secara normal berada dalam bentuk dimer yang reversibel diantara pH 5 dan 9 (Cegielska-Radziejewska et al. 2008; Onuma & Inaka 2008). Modifikasi lisozim dengan perlakuan panas menyebabkan denaturasi irreversibel lisozim dengan suhu denaturasi di atas 75°C (Belitz et al. 2009) sehingga mengakibatkan terjadinya akumulasi reaksi kimia seperti isomerisasi, imidesasi, deamidisasi dan rasemisasi dari asam amino (Cegielska-Radziejewska et al. 2008) yang meningkatkan aktivitas antibakterinya.

Penelitian menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri lisozim melalui perlakuan panas dipicu oleh perubahan konformasi dari molekul lisozim yang membentuk polimer. Perlakuan panas dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif dibandingkan dengan lisozim normal (Susanto et al. 2013). Lisozim hasil perlakuan panas juga tetap mempertahankan aktivitas bakteristatik terhadap bakteri Gram positif, yang merupakan karakteristik lisozim sebagai monomer sebelum diberikan perlakuan. Lisozim dapat merusak dan menembus bakteri Gram negatif karena lisozim berinteraksi dengan membran bakteri dan menempel pada bagian lipopolisakarida yang diperkuat oleh komposisi asam amino hidrofobik pada permukaan lisozim akibat perlakuan panas yang menyebabkan perubahan struktur lisozim (Cegielska-Radziejewska et al. 2008). Perlakuan panas terhadap lisozim memperlihatkan aktivitas bakterisidal yang kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* (Susanto et al. 2013).



(A) Model *barrel-stave*; (B) Model *toroidal*; (C) Model *carpet*

Gambar 4. Aksi peptida merusak membran bakteri

Sumber: Khursid et al. (2016)

Tabel 2. Aktivitas antibakteri peptida hasil hidrolisis lisozim dengan enzim protease

| Enzim (waktu/pH/suhu) | Peptida/sumber (negara) | Bakteri target/Gram bakteri (+/-) | Sumber |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Pepsin (1 jam/1,2/37°C) | Hidrolisat/PTA (USA) | <i>Staphylococcus carnosus</i> CECT 4491T (+) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (-) | Carrillo & Ramos (2018) |
| Pepsin (1 jam/1,2/37°C) | Hidrolisat/PTA (Spanyol) | <i>Oenococcus oeni</i> CIAL-91 (+) | Carrillo et al. (2014) |
| Papain dan tripsin (2 Jam/7,5/37°C) | NTDGSTTDYQILQINSR/lisozim PTA Merck kgAa Co (Jerman) | <i>E. coli</i> HP101BA-7601c (-) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC108309 (+) | Memarpoor-Yazdi et al. (2012) |
| Pepsin* | Hidrolisat/bubuk lisozim Pharma Food International (Jepang) | <i>Spora Bacillus subtilis</i> NBRC (+) <i>B. subtilis</i> NBRC (+) <i>Bacillus subtilis</i> NBRC-3013 (+) <i>Bacillus licheniformis</i> NBRC-12197 (+) <i>Bacillus pumilus</i> NBRC-12088 (+) <i>Bacillus mycoides</i> NBRC-3039 (+) <i>Bacillus coagulans</i> NBRC- 12583 (+) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NBRC-15535 (+) <i>Bacillus megaterium</i> NBRC-15308 (+) | Abdou et al. (2007) |
| Pepsin (2, 4 atau 24 jam/ 4/37°C) | Hidrolisat/PTA (Jepang) | <i>S. aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+) <i>B. subtilis</i> (+) <i>Micrococcus luteus</i> (+) <i>E. coli</i> K-12 (-) <i>B. bronchiseptica</i> (+) <i>S. enteritidis</i> (-) <i>Helicobacter pylori</i> (+) | Ibrahim et al. (2005) |
| Clostripain (3 jam/7,5/suhu ruang) | IVSDGNGMNAWV AWR/ PTA (Swiss) IVSDGNGMRAWV AWR/ PTA (Swiss) RAWV AWR/PTA (Swiss) RAWV AWR (enantiomer)/ PTA (Swiss) | <i>B. subtilis</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) <i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+) <i>Streptococcus zoopidermicus</i> (+) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) <i>Serratia marcescens</i> (-) <i>Micrococcus luteus</i> (+) <i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+) <i>Streptococcus zoopidermicus</i> (+) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-) <i>Staphylococcus aureus</i> (+) <i>S. lentus</i> (+) <i>S. epidermidis</i> (+) <i>S. aureus</i> (+) | Pellegrini et al. (1997) |

*: Tidak ada informasi mengenai waktu, pH dan suhu; PTA: Putih telur ayam; (+): Gram positif; (-): Gram negatif

Lisozim yang telah dimodifikasi dapat menembus *lipid bilayer* dan mengganggu proses elektrokimia membran dan membentuk lubang membran.

Ibrahim et al. (1996) menjelaskan bahwa lisozim memiliki bagian dalam molekul yang hidrofobik serta bagian luar molekul yang hidrofilik dan berkontak dengan molekul lain. Perlakuan panas akan menyebabkan perubahan konformasi karena terdapat dua jembatan yang mengenai asam amino sistein terputus sehingga hidrofobitas akan meningkat. Ketika Cys64-Cys80 dan Cys76-Cys94 atau ikatan disulfida lisozim terputus oleh proses panas maka asam amino triptofan 62, 63 dan 108 di dalam molekul terekspos keluar (Vilcundo et al. 2018). Hal ini menyebabkan aktivitas antibakteri meningkat karena ikatan terhadap membran akan meningkat.

Lisozim pada telur yang telah lama disimpan juga dapat berasosiasi menjadi bentuk dimer yang irreversibel. Berdasarkan perubahan konformasi tersebut, aktivitas lisozim sebagai enzim mengalami inaktivasi termal secara berangsur pada pH netral dan pada suhu yang berbeda (Cegielska-Radziejewska et al. 2008). Namun perlakuan panas terhadap lisozim dapat menghasilkan peningkatan aktivitas antibakteri

terhadap bakteri Gram negatif yang disebabkan peningkatan kemampuan lisozim menempel pada bagian lipopolisakarida membran luar dinding sel bakteri karena perubahan struktur molekul lisozim yang memunculkan gugus asam amino hidrofobik ke permukaan lisozim (Susanto et al. 2013) sehingga lebih mudah dalam merusak membran bakteri Gram negatif. Peningkatan aktivitas antibakteri dengan perlakuan panas dibuktikan oleh terjadinya penghambatan pertumbuhan pada bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* K12, *Salmonella enteritidis*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Lesnierowski et al. 2001). Adapun aktivitas antibakteri lisozim yang dimodifikasi dengan perlakuan panas dapat dilihat pada Tabel 3.

Aktivitas antibakteri lisozim dapat ditingkatkan dengan perlakuan panas yang menyebabkan lisozim terdenaturasi sehingga terjadi perubahan komposisi asam amino karena perubahan lipatan struktur tersier lisozim (Lesnierowski et al. 2001; 2004; Susanto et al. 2013). Selain itu, penelitian aktivitas antibakteri dari peptida lisozim yang dihasilkan dengan hidrolisis menggunakan enzim protease serta dikombinasikan dengan perlakuan panas menghasilkan lisozim dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif dan

Tabel 3. Aktivitas antibakteri lisozim dengan pemanasan pada beberapa suhu

| Suhu (waktu)/pH | Sumber lisozim/negara | Bakteri target (BT)/Gram bakteri (+/-) | Sumber |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 40°C (20 menit)* | PTA ras/Indonesia | <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (+) | Susanto et al. (2013) |
| 45°C (20 menit)* | | <i>Escherichia coli</i> (-) | |
| | | <i>M. lysodeikticus</i> (+) | |
| | | <i>E. coli</i> (-) | |
| 50°C (20 menit)* | | <i>M. lysodeikticus</i> (+) | |
| | | <i>E. coli</i> (-) | |
| 60°C (20 menit)/4,4 | PTA Petelur Astra S/ Polandia | <i>E. coli</i> ATCC 259220 (-) | Lesnierowski & Cegielska-Radziejewska (2012) |
| 80°C (20 menit)/5-6 | | <i>M. luteus</i> (+) | |
| | | <i>E. coli</i> ATCC 259220 (-) | Lesnierowski et al. (2001) |
| 80°C (20 menit)/7,2 | PTA (Jepang) | <i>E. coli</i> K-12 (-) | Ibrahim et al. (1996) |
| | | <i>Staphylococcus aureus</i> (+) | |
| 80°C (20 menit)/6 | PTA (Spanyol) | <i>Acetobacter aceti</i> CIAL-106 (-) | Carrillo et al. (2014) |
| | | <i>Gluconobacteri oxydans</i> CIAL-107 (-) | |
| 90°C (20 menit)/6 | | <i>A. aceti</i> CIAL-106 (-) | |
| | | <i>G. oxydans</i> CIAL-107 (-) | |
| | | <i>Oenococcus oeni</i> CIAL-91 (+) | |
| | | <i>Pediococcus pentosaceus</i> CIAL-85(+) | |
| 95°C (20 menit)/6 | | <i>A. aceti</i> CIAL-106 (-) | |
| | | <i>O. oeni</i> CIAL-91 (+) | |
| | | <i>Lactobacillus casei</i> CIAL-52 (+) | |

*: Tidak ada informasi mengenai pH; PTA: Putih telur ayam; (+): Gram positif; (-): Gram negatif

Tabel 4. Aktivitas antibakteri lisozim dengan perlakuan kombinasi panas dan enzimatis

| Suhu (waktu/pH)/enzim (waktu/pH) | Peptida/sumber lisozim (negara) | Bakteri target/Gram bakteri (+/-) | Sumber |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 95°C (20 menit/6)/Pepsin (1 jam/2) | Hidrolisat/PTA (USA) | <i>S. carnosus</i> CECT-4491T (+) <i>E. coli</i> ATCC-25922 (-) | Carrillo & Ramos (2018) |
| 95°C (20 menit/6)/Pepsin (1 jam/2) | Hidrolisat/PTA (USA) | <i>Oenococcus oeni</i> CIAL-96 (+) <i>Acetobacter aceti</i> CIAL-106 (-) <i>Gluconobacteri oxydans</i> CIAL-107 (-) | Carrillo et al. (2014) |
| 95°C (30 menit)*/Pepsin 121°C /Pepsin (15 menit)* | Bubuk lisozim Pharma Food International (Jepang) | <i>Bacillus subtilis</i> (+) <i>B. subtilis</i> (+) | Abdou et al. (2007) |
| 95°C (20 menit)*/Pepsin (1 jam/1) & Tripsin (24 jam/8) | Hidrolisat (IVSDGMNAW)/PTA (Kanada) Hidrolisat (IVSDGMNAW)/PTA (Kanada) | <i>E. coli</i> K-12 (-) <i>S. aureus</i> 23-394 (+) | Mine et al. (2004) |

*: Tidak ada informasi mengenai pH; PTA: Putih telur ayam; (+): Gram positif; (-): Gram negatif

menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas antibakteri yang dapat dilihat pada Tabel 4. Aktivitas antibakteri tersebut dapat diukur melalui berbagai metode (Balouiri et al. 2016), metode yang direkomendasikan adalah metode mikrodilusi (*microdilution*) karena dapat menghemat sampel yang digunakan dan dapat diperoleh nilai *minimum inhibitory concentration*.

PERAN LISOZIM DALAM BIDANG PANGAN DAN KESEHATAN

Lisozim umumnya memiliki aktivitas antibakteri sehingga dapat digunakan sebagai pengawet. Selain itu, lisozim dapat menghasilkan peptida bioaktif yang menunjukkan aktivitas lain setelah perlakuan enzimatis maupun perlakuan panas (You et al. 2010). Beberapa penelitian mengenai aktivitas antibakteri memberikan informasi bahwa peptida lisozim dapat dimanfaatkan sebagai pengawet alami pada pangan secara langsung, dikombinasi dengan antimikroba lain, maupun ditambahkan dalam kemasan *edibel* (Barbiroli et al. 2012; Perez-Espitia et al. 2012; Wulandari et al. 2015; Valdes et al. 2017). Penggunaan peptida lisozim sebagai pengawet pangan ini berperan untuk menghambat atau menghentikan pertumbuhan bakteri patogen yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan.

Peran peptida lisozim secara langsung pada kesehatan yaitu memberikan pengaruh biologis pada tubuh karena peptida memiliki aktivitas biologis seperti antihipertensi, penghambat *angiotensin-converting enzyme*, antioksidan (Rao et al. 2012), antivirus dan antitumor (Ya-Fei et al. 2017). Adapun secara tidak langsung lisozim dapat mencegah penyakit atau infeksi bakteri patogen yang masuk ke dalam tubuh melalui pangan. Adanya lisozim dan peptida lisozim sebagai

pengawet pangan seperti pada keju, sayuran, daging, ikan dan susu (Cegielska-Radziejewska et al. 2009b, Lesnierowski, & Kijowski 2009; Schneider et al. 2011; Roldan et al. 2012; Liburdi et al. 2014; Herath et al. 2015; Brasca et al. 2016; Asmaa et al. 2017) dapat meminimalisir terjadinya penyakit yang disebabkan oleh bakteri dari Gram positif maupun Gram negatif, selain meningkatkan umur simpan dan mencegah pangan dari kerusakan. Adapun aplikasi lainnya, lisozim dan peptidanya dapat ditambahkan sebagai bahan untuk pangan fungsional (Prosapio et al. 2016).

KESIMPULAN

Lisozim merupakan protein bioaktif dari putih telur yang dapat diaplikasikan dalam bidang pangan sebagai pengawet karena memiliki aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri lisozim dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan keamanan pangan dan kesehatan. Peptida lisozim hasil dari hidrolisis enzim protease maupun lisozim hasil modifikasi panas dapat dimanfaatkan untuk mengoptimalkan aksi lisozim sebagai antibakteri untuk mencegah tumbuhnya bakteri perusak dan patogen yang beragam. Peptida lisozim dapat juga digunakan sebagai pengganti bahan sintesis yang lebih aman seperti pengawet pangan dan antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang membantu dalam pendanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdou AM, Higashiguchi S, Aboueleinin AM, Kim M, Ibrahim HR. 2007. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against bacillus species. *Food Control*. 18:173-178.
- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU. 2013a. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents: A review. *Poult Sci*. 93:3992-3299.
- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU. 2013b. Sequential separation of lysozyme and ovalbumin from chicken egg white. *Korean J Food Sci An*. 33:501-507.
- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU. 2014. Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferin, and ovalbumin from egg white. *Poult Sci*. 93:1001-1009.
- Alhazmi A, Stevenson JW, Amartey S, Qin W. 2014. Discovery, modification and production T4 lysozyme for industrial and medical use. *Int J Biol*. 6:45-63.
- Almsned F. 2017. Designing antimicrobial peptide: Current status. *J Med Sci Clin Res*. 5:19282-19294.
- Aminlari L, Hashemi MM, Aminlari M. 2014. Modified lysozymes as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in foods. *J Food Sci*. 79:R1077-90.
- Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. 2016. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resist Updat*. 26:43-57.
- Asmaa MSF, Hala A, Shereen AY. 2017. Use of lysozyme to control *Staphylococcus aureus* and its effect on shelf life of chilled chicken fillet. *Anim Heal Res J*. 5:146-152.
- Asoodeh A, Memarpour-Yazdi M, Chamani J. 2012. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chem*. 131:291-295.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *J Pharm Anal*. 6:71-79.
- Barbiroli A, Bonomi F, Capretti G, Iametti S, Manzoni M, Piergiovanni L, Rollini M. 2012. Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*. 26:387-392.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Eggs. In: *Food Chem*. Berlin (Germany): Springer; p. 546-562.
- Benkerroum N. 2008. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J Biotechnol*. 7:4856-4867.
- Brand J, Dachmann E, Pichler M, Lotsz S, Kulozik U. 2016. A novel approach for lysozyme and ovotransferrin fractionation from egg white by radial flow membrane adsorption chromatography: Impact of product and process variables. *Sep Purif Technol*. 161:44-52.
- Brasca M, Morandi S, Silvetti T, Rosi V, Cattaneo S, Pellegrino L. 2016. Defferent analytical approach in assessing antibacterial activity and the purity of commercial lysozyme preparations for dairy application. *Molecules*. 18:6008-6020.
- Callewaert L, Herreweghe JM V, Vanderkelen L, Leysen S, Voet A, Michiels CW. 2012. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends Microbiol*. 20:501-510.
- Callewaert L, Michiels. 2010. Lysozyme in the animal kingdom. *J Biosci*. 35:127-160.
- Cannarsi M, Baiano A, Sinigaglia M, Ferrara L, Baculo R. 2008. Use of nisin, lysozyme, and EDTA for inhibiting microbial growth in chilled buffalo meat. *Int J Food Sci Technol*. 45:573-578.
- Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, Moreno-Arribas M V. 2014. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *J Food Prot*. 77:1732-1739.
- Carrillo W, Lucio A, Gaibor J, Morales D, Vasquez G. 2018. Isolation of antibacterial hydrolysates from hen egg white lysozyme and identification of antibacterial peptides. *J Med Food*. 21:808-818.
- Carrillo W, Ramos M. 2018. Identification of Antimicrobial Peptides of Native and Heated Hydrolysates from hen egg white lysozyme. *J Med Food*. 21:915-926.
- Carrillo W, Tubon J, Vilcacundo R. 2016. Isolation of hen egg white lysozyme by cation exchange chromatography, analysis of its digestibility and evaluation of the inhibition lipid peroxidation in the zebrafish model. *Asian J Pharm Clin Res*. 9:345-349.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J. 2008. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations-a review. *J Food Nutr Sci*. 58:5-10.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J. 2009a. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur Food Res Technol*. 228:841-845.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J, Szablewski T, Zabielski J. 2009b. Effects of treatment with lysozyme and its polymers on the microflora and sensory properties of chilled chicken breast muscles. *Bull Vet Inst Pulawy*. 53:455-461.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Szablewski T, Kijowski J. 2010. Physico-chemical properties and antibacterial activity of modified egg white-lysozyme. *Eur Food Res Technol*. 231:959-964.
- Cegielska-Radziejewska R, Tomasz S. 2014. Inhibition of food-borne bacteria by thermo-chemically modified egg white lysozyme. *African J Microbiol Res*. 8:590-597.

- Chiu H, Lin J, Cheng T, Chou S, Huang C. 2012. Direct purification of lysozyme from chicken egg white using weak acidic polyacrylonitrile nanofiber-based membranes. *J Appl Polym Sci.* 125:616-621.
- Dekina SS, Romanovska II, Ovsepyan AM, Bodyu MG, Toptikov VA. 2015. Isolation and purification the hen egg white. *Biotechnol Acta.* 8:41-47.
- Eckert E, Zambrowicz A, Pokora M, Polanowski A, Chrzanowska J, Szoltysik M, Dąbrowska A, Różański H, Trziszka T. 2013. Biologically active peptides derived from egg proteins. *World's Poult Sci J.* 69:375-386.
- Gonzalez R, Albercio F, Cascone O, Iannucci NB. 2010. Improved antimicrobial activity of h-lysozyme (107-115) by ratinal ala substitution. *J Pept Sci.* 22:123-128.
- Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 46:412-429.
- Hamzah A, Hamzah S, Nasir FM, Ariffin MM. 2015. Isolation and purification of lysozyme from albumin: Effect of albumin concentration, pH, and ionic strength of buffer solution. *Malay J Anal Sci.* 20:799-805.
- Hamzah S, Nasir FM, Hamzah A. 2014. Lysozyme adsorption onto immobilized metal affinity chromatographic adsorbent: effect of pH and ion strength. *Inte J App Eng Res.* 9:17783-17792.
- Held J, Smaalen S V. 2014. The active site of hen egg white lysozyme: flexibility and chemical bonding. *Acta Cryst.* 70:1136-1146.
- Herath AHMEI, Priyanath JJM, Ahn DU, Abeyrathne EDNS. 2015. Use of lysozyme from chicken egg white as a nitrite replacer in an itlian-type chichken sausage. *Functional Foods Heal Dis.* 5:320-330.
- Hiidenhovi J. 2007. Ovomucin. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioact Egg Compd.* Berlin (Germany): Springer; p. 61-68.
- Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R. 2007. *Bioactive Egg Compounds.* Berlin (Germany): Springer.
- Ibrahim HR, Higashiguchi S, Juneja LR, Kim M, Yamamoto T. 1996. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J Agric Food Chem.* 44:1416-1423.
- Ibrahim HR, Inazaki D, Abdou A, Aoki T, Kim M. 2005. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochim Biophys Acta.* 1726:102-114.
- Islam R, Kite J, Baker AS, Ching Jr A, Islam MR. 2006. Affinity purification of hen egg lysozyme using sephadex G75. *African J Biotechnol.* 5:1902-1908.
- Joao PS, Rui AA, Francisco MG. 2016. Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Biotechnol Adv.* 34:924-940.
- Khursid Z, Naseem M, Seijh Z, Najeeb S, Shahab S, Zafar MS. 2016. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharm J.* 24:515-524.
- Ko KY, Mendonca AF, Ahn DU. 2009. Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poult Sci.* 87:1649-1658.
- Kose K, Denizli A. 2013. Poly (hydroxyethylmethacrylate) based magnetic nanoparticles for lysozyme purification from chicen egg white. *Artif Cell Blood Substit Biotechnol.* 41:13-20.
- Kusumaningtyas E. 2018. Aplikasi peptida pada teknologi veteriner dan produksi ternak. *Wartazoa.* 28:89-98.
- Kusumaningtyas E, Suhartono MT, Widiastuti R, Kusumaningrum HD. 2015a. Antimicrobial and antioxidative activities of peptidas from goat milk hydrolyzed with various protease. *JITV.* 20:175-183.
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2015b. Aktivitas antibakteri dan antioksidan hidrolisat hasil hidrolisis protein susu kambing dengan ekstrak kasar bromelin. *J Teknol Ind Pangan.* 6:179-188.
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2016a. Bioactivities and analysis of peptides of sumbawa horse milk generated by bacillus thuringiensis protease. *JITV.* 21:244-254.
- Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Kusumaningrum HD, Suhartono MT. 2016b. Antibacterial and antioxidant activities of goat milk hydrolysate generated by bacillus sp. E.13. *Glob Vet.* 16:105-110.
- Lechevalier V, Croguennec T, Nau F, Guerin-Dubiard C. 2007. Ovalbumin and gene-related proteins. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioact Egg Compd.* Berlin (Germany): Springer; p. 51-60.
- Lee TH, Kriptopher N, Aguilar MI. 2016. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Curr Top Med Chem.* 16:25-39.
- Lesnierowski G. 2009. New methods of physic-chemical modification of lysozyme. *Nauk Przyr Techn.* 3:1-18.
- Lesnierowski G, Cegielska-Radziejewska R. 2012. Potential possibilities of production, modification and partical application of lysozyme. *Acta Sci Tech Aliment.* 11:223-230.
- Lesnierowski G, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J. 2001. Antibacterial activity of thermally medified lysozyme. *Elec J Pol Agr Univ.* 4:1-9.
- Lesnierowski G, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J. 2004. Thermally and chemical-thermillay modified lysozyme and its bacteriostatic activity. *World's Poult Sci J.* 60:303-310.
- Lesnierowski G, Kijowski J. 2007. Lysozyme. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors.

- Bioact Egg Compd. Berlin (Germany): Springer; p. 33-42.
- Lesnierowski G, Kijowski J, Cegielska-Radziejewska R. 2009. Ultrafiltration modified chicken egg white lysozyme and its antibacterial action. *Int J Food Sci Technol.* 44:305-311.
- Lesnierowski G, Stangierski J. 2018. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. *Trends Food Sci Technol.* 71:46-51.
- Lestari D, Soesilo V. 2017. Aktivitas antibakteri peptida kasein susu kambing hidrolisis oleh papain terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ilmu Pangan dan Has Pertan.* 1:81-92.
- Liburdi K, Benucci I, Esti M. 2014. Lysozyme in wine: an overview of current and future application. *Compre Rev Food Sci Food Saf.* 13:1062-1073.
- Lohner K, Hilpert K. 2016. Antimicrobial peptides: cell membrane and microbial surface interactions. *Biochim Biophys Acta.* 1858:915-917.
- Lucera A, Costa C, Conte A, Nobile MAD. 2012. Food Application of natural antimicrobial compound. *Front Microbiol.* 3:1-13.
- Mangalassary S, Han I, Rieck J, Acton J, Dawson P. 2008. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control *Lysztteria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna during refrigerated storage. *Food Microbiol.* 25:866-870.
- Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani J. 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptida from hen egg white lysozyme hydrolysates. *J Funct Foods.* 4:278-286.
- Mine Y, Ma F, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem.* 52:1088-1094.
- Mol PCG, Verissimo LAA, Eller MR, Minim VPR, Minim LA. 2017. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme form chicken egg white. *J Chromatogr B.* 1044:17-23.
- Nau F, GueRin-Dubiard C, Croguennec T. 2007. Avidin. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioact Egg Compd.* Berlin (Germany): Springer; p. 75-80.
- Onuma K, Inaka K. 2008. Lysozyme dimer association: similarities and differences compared with lysozyme monomer association. *J Cryst Growth.* 310:1174-1181.
- PDSIP. 2017. Outlook komoditas pertanian sub sketor peternakan telur. Jakarta (Indonesia): Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Sekretaris Jendral, Kementerian Pertanian.
- Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Klauser S, Hunziker P, Fellenberg R V. 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J Appl Microbiol.* 82:372-378.
- Perez-Espitia PJ, Ferreira-Soares NF, Coimbra JSR, Andrade NJ, Cruz RS, Alves-Medeiros EA. 2012. Bioactive peptides: synthesis, properties, and application in the packaging and preservation of food. *Comp Rev Food Sci Technol.* 11:187-204.
- Prosapio V, Reverchon E, Marci I. 2016. Production of lysozyme microparticles to be used in functional fods, using an expanded liquid antisolvent process. *J Supercrit Fluid.* 107:106-113.
- Radziejwska RC, Szablewski T. 2013. Effect of modified lysozyme on the microflora and sensory attributes of ground pork. *J Food Prot.* 76:338-342.
- Rao S, Chandar R, Sharma A. 2008. Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *Food Sci Technol.* 41:1995-2001.
- Rao S, Sun J, Liu Y, Zeng H, Su Y, Yang Y. 2012. ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Chem.* 135:1245-1252.
- Rawdkuen S, Suthiluk P, Kamhangwong D, Banjakul S. 2012. Antimicrobial activity of some potential active compounds against food spoilage microorganisms. *African J Biotechnol.* 11:13914-13921.
- Rehault S. 2007. Antiproteases. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioact Egg Compd.* Berlin (Germany): Springer; p. 85-92.
- Roldan M, Lasanta C, Caro I, Palacios. 2012. Effect of lysozyme on "flor" velum yeast in the biological aging of sherry wines. *Food Microbiol.* 30:245-252.
- Safarik LZ, Sabatkova, Oldrich T, Savfarikov T. 2007. Magnetic cation exchange isolation of lysozyme from native hen egg whit. *Food Technol Biotechnol.* 45:355-359.
- Schneider N, Werkmeister K, Becker CM, Pishchetsrieder. 2011. Prevalence and stability of lysozyme in cheese. *Food Chem.* 128:145-151.
- Shahidi F, Zhong Y. 2008. Bioactive peptides. *J AOAC Int.* 91:914-931.
- Shahmohammad A. 2017. Lysozyme separation from chicken egg white: A review. *Eur Food Res Technol.* 224:577-593.
- Silvetti T, Morandi S, Hintersteiner M, Brasca M. 2017. Use of hen egg white lysozyme in the food industry. In: *Egg innovations and strategies for improvements.* London (UK): Academic Press. p. 233-242.
- Sinigagli M, Bevilaqua A, Corbo MR, Pati S, Del Nobile MA. 2008. Use of active compounds for prolonging the self life of mozzarella cheese. *Int Dairy J.* 18:624-630.
- Soekarto ST. 2013. Teknologi penanganan dan pengolahan telur. Bandung (Indonesia): Alfabeta.
- Stephanie AR, Alson KC. 2017. From bacterial killing to immune modulation: Recent insight into the functions of lysozyme. *PLOS Phatogens.* 2017:1-22.

- Strynadka NCJ, James MNG. 1991. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an n-acetylmuramic acid residue bond in site D. *J Mol Biol.* 220:401-424.
- Superti F, Ammendolia MG, Berlutti F, Valenti P. 2007. Ovotransferrin. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioact Egg Compd.* Berlin (Germany): Springer; p. 43-50.
- Susanto E. 2012. Kajian isolasi lisozim putih telur dengan menggunakan mika. *J Ternak.* 3:19-24.
- Susanto E, Rosyidi D, Radiati LE, Manab A. 2013. Improved antibacterial spectrum of hen egg white lysozyme with thermal modified. *Int J Engineering Res Technol.* 2:589-593.
- Tankrathok A, Daduang S, Patramanon R, Arakai T, Thammasirirak S. 2009. Purification process for the preparation and characterization of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin and ovomucoid. *Prep Biochem Biotechnol.* 39:380-399.
- Thammasirirak SY, Pukcothanung Y, Preecharram S, Daduang S, Patramanon R, Fukamizo T, Araki T. 2010. Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comp Biochem Physiol.* 151:84-91.
- Tribst AAL, Ribeiro LR, Cristianini M. 2017. Comparison of the effect of high pressure homogenization and high pressure processing on the enzyme activity and antimicrobial profile of lysozyme. *Innov Food Sci Emerging Technol.* 43:60-67.
- Valdes A, Ramos M, Beltrán A, Jiménez A, Garrigós MC. 2017. State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications. *Coatings.* 7:1-23.
- Vilcacundo R, Mendez P, Reyes W, Romero H, Pinto H, Carrillo W. 2018. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme by thermal and chemical treatments. *Sci Pharm.* 86:2-17.
- Wulandari Z. 2018. Karakteristik lisozim dari telur unggas lokal sebagai pemanis [Dissertation]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Wulandari Z, Fardiaz D, Budiman C, Suryati T, Herawati D. 2015. Purification of egg white lysozyme from Indonesian kampung chicken dan ducks. *Media Peternak.* 38:18-26.
- Ya-Fei L, Oey I, Bremer P, Carne A, Silcock. 2017. Bioactive peptides derived from egg proteins: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 13:1-23.
- You SJ, Udenigwe CC, Aluko RE, Wu J. 2010. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Res Int.* 43:848-855.