

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI PEDIOSIN YANG DIPRODUKSI OLEH *Pediococcus pentosaceus* 2A2

[Purification and Characterization of Pediocin Produced
by *Pediococcus pentosaceus* 2A2]

Ni Wayan Triwulandhari¹⁾, Betty S. L. Jenie^{2)*}, Hanifah N. Lioe²⁾, dan Irma Isnafia Arief³⁾

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 9 Agustus 2018 / Disetujui 21 Februari 2019

ABSTRACT

*Pediocin production by *Pediococcus pentosaceus* 2A2 was done in 30% molasses based medium at 37°C for 24 hours. The culture was then centrifuged to separate the cells and yield cell-free supernatant (CFS). Purification of the CFS was carried out by stepwise ammonium sulfate precipitation to achieve a 90% concentrate, followed by dialysis using membrane with a molecular weight cut off 2.0 kDa resulting in pediocin crude extract (PCE). The PCE was purified by cation exchange chromatography using SP Sephadex C-25 and eluted with sodium acetat buffer at pH of 5.5; 6.0; 6.5; and 7.0 successively resulting in 4 fractions (F1, F2, F3, F4). Each purification step resulted in the increase in antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. The PCE had specific antimicrobial activity up to 5 fold higher than the CFS. F4 fraction, which showed the largest inhibition zone among the other fractions, had a very high specific activity up to 435 fold higher than the CFS. The SDS-PAGE analysis suggested that the molecular weight of F4 was approximately 5.9 kDa. The minimum inhibitory concentration (MIC) of F4 to inhibit 1 log (90%) of *L. monocytogenes* ATCC 7644 was 143 ppm. The inhibitory phenomenon observed under scanning electron microscope (SEM) showed that *L. monocytogenes*'s cells exposed to F4 experience morphological changes such as cells shrinkage.*

Keywords: characterization, molasses, pediocin, *Pediococcus pentosaceus* 2A2, purification

ABSTRAK

Produksi pediosin oleh *Pediococcus pentosaceus* 2A2 dalam media berbasis molase 30%, dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam lalu dipisahkan selnya dengan sentrifugasi sehingga dihasilkan supernatant bebas sel (SBS). Pemurnian SBS pediosin dilakukan dengan metode pengendapan amonium sulfat secara bertahap hingga konsentrasi 90%, diikuti dialisis menggunakan membran *cut off* 2,0 kDa untuk memperoleh ekstrak kasar pediosin (EKP). EKP dimurnikan dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25, dengan elusi bufer natrium asetat pada pH 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0 sehingga berturut-turut dihasilkan 4 fraksi (F1, F2, F3, F4). Jika dibandingkan dengan SBS, EKP memiliki aktivitas spesifik terhadap *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 lebih tinggi 5 kali lipat. Fraksi F4, yang menunjukkan zona hambat terbesar di antara fraksi lainnya, memiliki aktivitas spesifik 435 kali lipat lebih tinggi dibandingkan SBS. Karakterisasi dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa F4 memiliki berat molekul sekitar 5,9 kDa. *Minimum inhibitory concentration* (MIC) yang mampu menghambat 90% (1 log) pertumbuhan *L. monocytogenes* ATCC 7644 adalah sebesar 143 ppm. Fenomena penghambatan F4 pada konsentrasi 2 x MIC terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644 di bawah *scanning electron microscope* (SEM) mengindikasikan perubahan morfologi sel berupa pengecilan ukuran sel.

Kata kunci: karakterisasi, molase, *Pediococcus pentosaceus* 2A2, pediosin, pemurnian

*Penulis Korespondensi:
Email: betty_jenie@yahoo.com; wayanwulan@gmail.com

PENDAHULUAN

Pediosin yang merupakan salah satu bakteriosin yang diproduksi oleh *Pediococcus* spp. dapat menjadi alternatif pengawet alami untuk industri pangan (Kaur *et al.*, 2012). Produksi pediosin umumnya membutuhkan media pertumbuhan BAL yaitu *deMan Rogosa Sharp Broth* (MRSB) yang harganya relatif mahal. Mulyani (2019) telah berhasil memproduksi ekstrak kasar pediosin (EKP) dengan memodifikasi MRSB menggunakan molase 30% dan *Pediococcus pentosaceus* 2A2, yang diisolasi dari daging sapi lokal daerah Bogor (Arief *et al.*, 2015b). EKP yang dihasilkan terbukti memiliki zona hambat terhadap *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 yang tidak berbeda nyata jika menggunakan media MRSB (kontrol).

Pediosin perlu dimurnikan dan dikarakterisasi agar dapat diaplikasikan pada berbagai bahan pangan. Penggunaan metode pemurnian yang berbeda dapat menghasilkan aktivitas spesifik yang berbeda pula (Simha *et al.*, 2012). Pemurnian pediosin menggunakan amonium sulfat dilanjutkan dengan kromatografi pertukaran kation dapat meningkatkan aktivitas spesifik hingga 33,8 kali lipat (Kingcha *et al.*, 2012) bahkan paling tinggi hingga 340 kali lipat (Simha *et al.*, 2012), sementara pemurnian pediosin menggunakan partisi dua fase cairan antara polimer PEG 1450 dan kalium fosfat diikuti ultrafiltrasi hanya meningkatkan aktivitas spesifik hingga 7,3 kali lipat (Garsa *et al.*, 2014b). Umumnya semakin tinggi kemurnian pediosin, maka aktivitas spesifiknya ikut meningkat. Aktivitas spesifik pediosin dari pediosin PA-1/AcH (Kingcha *et al.*, 2012) dan pediosin PA-1 (Simha *et al.*, 2012; Garsa *et al.*, 2014b) meningkat seiring peningkatan kemurnian pediosin. Peningkatan aktivitas spesifik ini dapat disebabkan oleh terpisahnya peptida pediosin yang bersifat kationik, hidrofobik, berukuran kecil (<10 kDa) (Altuntas *et al.*, 2010; Elayaraja *et al.*, 2014) dari komponen-komponen lainnya yang tidak diinginkan dalam aplikasinya sebagai pengawet pangan (Garsa *et al.*, 2014a).

Menurut Khan (2012), elusi kromatografi pertukaran kation dapat dilakukan dengan meningkatkan kekuatan ionik bufer ataupun mengubah pH bufer pada rentang 5-8. Saat ini, eluen yang umum digunakan dalam kromatografi pertukaran kation adalah bufer natrium asetat ataupun bufer natrium fosfat yang mengandung NaCl pada berbagai konsentrasi (0,1-1 M) (Simha *et al.*, 2012; Kingcha *et al.*, 2012; Sood *et al.*, 2013; Mehla dan Sood, 2011a). Sementara dalam penelitian ini digunakan bufer natrium asetat pada berbagai pH yaitu 5,5-7,0 sebagai eluennya, dan belum ada peneliti yang melaporkan hasil elusi dengan bufer menggunakan variasi pH.

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari Mulyani (2019) yang telah berhasil memproduksi

pediosin menggunakan *P. pentosaceus* 2A2 dalam media berbasis molase 30%. Pemurnian pediosin dilakukan melalui tahap pengendapan amonium sulfat dilanjutkan dialisis serta kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25, dengan elusi bufer natrium asetat pada variasi pH, yaitu 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0. Selanjutnya pediosin murni dikarakterisasi melalui penentuan berat molekul, pengukuran MIC terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644, dan pengaruh pediosin murni terhadap morfologi sel *L. monocytogenes* ATCC 7644, yang diamati di bawah SEM. Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini adalah tahap pemurnian yang dilakukan mampu meningkatkan kemurnian pediosin melalui peningkatan aktivitas spesifik pediosin sehingga dapat menjadi dasar untuk produksi pediosin sebagai bahan pengawet alami pangan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu molase yang didapat dari PT. Rajawali Nusantara di Subang, kultur *Pediococcus pentosaceus* 2A2 yang diperoleh dari Laboratorium Terpadu Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan IPB di Bogor, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Oxoid, Canada), garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ serta gel kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 (Merck, Germany).

Produksi supernatan bebas sel (SBS) pediosin

Produksi SBS pediosin mengacu pada Mulyani (2019). Media molase 30% dibuat dengan mencampurkan 10 g/L pepton, 8 g/L ekstrak daging, 34 g/L ekstrak khamir (Oxoid, Canada), serta 2 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L tween 80, 2 g/L CH_3COONa , 2 g/L $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$, 0,2 g/L MgSO_4 , 0,05 g/L MnSO_4 (Merck, Germany) dan 300 g/L molase. Media tersebut diatur pada pH 6,2 dengan penambahan HCl 1 N dan NaOH 1 N. Media diinokulasi kultur *P. pentosaceus* 2A2 sebanyak 10% yang telah dipropagasi dalam MRSB pada suhu 37°C selama 24 jam (populasi bakteri 10^8 CFU/mL), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000xg, suhu 4°C, selama 15 menit dan supernatan dipanen, dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (Rotavapor® R11, Buchi®, Switzerland) pada suhu 60°C selama 2 jam hingga volume berkurang setengahnya lalu diatur pH menjadi 6,8-7,0. Sampel difiltrasi dengan membran Millipore 0,2 µm (Merck, Germany) sehingga dihasilkan SBS pediosin. SBS disimpan pada suhu 4°C selama menunggu analisis selanjutnya, yaitu pengukuran aktivitas antimikroba dan kadar protein.

Pengendapan amonium sulfat

Pemurnian tahap awal SBS pediosin mengacu pada prosedur yang dilakukan Mulyani (2019) meliputi pengendapan amonium sulfat yang dilanjutkan dengan dialisis sehingga dihasilkan ekstrak kasar pediosin (EKP). SBS diendapkan dengan garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan penambahannya dilakukan secara bertingkat hingga jenuh (20; 40; 60; 80; dan 90%) sambil diaduk menggunakan pengaduk magnetik (Thermolyne tipe Nouva II, USA). Pengadukan dilakukan pada suhu 4°C selama 2 jam lalu disentrifugasi pada kecepatan 12.000xg, suhu 4°C, selama 15 menit. Filtrat didialisis menggunakan membran *cut off* 2,0 kDa (Merck, Germany) sehingga dihasilkan EKP. EKP disimpan pada suhu 4°C selama menunggu analisis selanjutnya, yaitu pengukuran aktivitas antimikroba dan kadar protein.

Kromatografi pertukaran kation

EKP dimurnikan dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 yang mengacu pada Simha *et al.* (2012) dengan modifikasi. SP Sephadex C-25 disetimbangkan dengan bufer CH_3COONa 20 mM (pH 4,6) selama 1 jam, lalu dicampur EKP dengan rasio 1:1 dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 1 jam. Dibiarkan stabil, lalu supernatan dipisahkan dengan mikropipet (Gilson, USA). SP Sephadex C-25 dielusi dengan bufer CH_3COONa 20 mM pada variasi pH (5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0) sambil diaduk dengan pengaduk magnetik selama 1 jam. Penggunaan gel pertukaran kation hanya stabil pada pH 5-8. Kromatografi pertukaran kation membutuhkan pH minimal 1 unit lebih rendah daripada pH isoelektrik sampel, untuk memfasilitasi pengikatan dan elusi sampel yang cukup. Pediosin memiliki pH isoelektrik 8,67-8,85 (Mehla dan Sood, 2011a; Simha *et al.*, 2012). Sampel mulai terdisosiasi dan terelusi dari pertukaran kation pada interval 0,5 unit dari pH isoelektriknya sehingga 4 variasi pH yang digunakan untuk elusi sampel adalah pada pH 5,5; 6,0; 6,5; dan 7,0. Dari hasil separasi diperoleh 4 fraksi berdasarkan elusi dengan variasi pH. Keempat fraksi disimpan pada suhu 4°C sampai tahap analisis selanjutnya, yaitu pengukuran aktivitas antimikroba untuk menentukan fraksi terpilih yang memiliki zona hambat terbesar. Fraksi terpilih selanjutnya diukur kadar proteinnya untuk dapat dihitung aktivitas spesifiknya.

Penentuan aktivitas total pediosin

Pengukuran aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode cakram (Bhattacharya dan Das, 2010). *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang telah ditumbuhkan pada media *Trypticase Soy Broth* (TSB) (Oxoid, Canada) pada suhu 37°C selama 24 jam (populasi bakteri 10^8 CFU/mL) diinokulasikan sebanyak 0,1 mL pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid, Canada) (15-20 mL) yang telah ditu-

ang pada cawan petri. MHA dibiarkan memadat lalu ditempelkan kertas cakram berdiameter 6 mm (Merck, Germany) yang telah menyerap sampel pediosin hasil pemurnian sebanyak 23 μL . Cawan dikondisikan pada suhu 4°C selama 2 jam sehingga sampel pediosin dapat berdifusi ke dalam agar, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang positif ditunjukkan dengan zona bening di sekitar kertas cakram lalu diukur diameternya menggunakan jangka sorong digital (KW06-351, Krisbow, Germany).

Aktivitas total pediosin didefinisikan dengan AU (Aktivitas Unit), yaitu 1 AU dinyatakan sebagai rasio luas zona bening dikurangi luas kertas cakram (mm^2) terhadap volume sampel pediosin yang diujikan (mL) (Abbasiliasi *et al.*, 2014).

Pengukuran kadar protein

Metode pengukuran kadar protein mengacu pada Lowry *et al.* (1951) dengan standar protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Merck, Germany) pada konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg/mL. Standar dan sampel pediosin hasil pemurnian masing-masing sebanyak 100 μL diisikan pada lubang 96 *well microplate* (Costar 3590, Corning, USA) kemudian ditambah dengan 200 μL pereaksi biuret yang diperoleh dengan mencampurkan 0,5 mL CuSO_4 1%, 0,5 mL $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ 2%, dan 50 mL Na_2CO_3 2% (Merck, Germany) dalam NaOH 0,1 N. Larutan didiamkan pada suhu ruang selama 10-15 menit, lalu ditambah dengan 20 μL pereaksi Folin & Ciocalteu 1 N (Merck, Germany) kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi dibaca menggunakan *microplate reader* (Benchmark, Bio-Rad, USA) pada panjang gelombang 655 nm.

Penentuan aktivitas spesifik pediosin

Aktivitas spesifik pediosin (AU/mg) dihitung berdasarkan rasio dari aktivitas total pediosin (AU) terhadap total protein pediosin (mg) (Kingcha *et al.*, 2012). Rendemen (%) dihitung berdasarkan rasio volume sampel setelah dan sebelum tahap pemurnian (Tiwari dan Srivastava, 2008). Kemurnian relatif dihitung berdasarkan rasio aktivitas spesifik setelah dan sebelum tahap pemurnian (Hata *et al.*, 2010).

Penentuan berat molekul fraksi pediosin

Fraksi pediosin terpilih diukur berat molekulnya menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Gel poliakrilamida yang digunakan adalah gel pemisah 15% dan gel pengumpul 4% (Mulyani, 2019). Penanda pita protein (*marker*) yang digunakan adalah *Marker Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder* (Thermo Scientific, USA) dengan berat molekul rendah, yaitu 4,6-40 kDa. Sebanyak 60 μL fraksi pediosin terpilih dan *marker* diteteskan pada sumur gel lalu

dielektroforesis dengan arus 20 mA, voltase 60 V, selama 3 jam. Gel direndam dengan AgNO_3 0,1% (Merck, Germany) kemudian dicuci dengan akuabides. Setelah itu terlihat pita-pita protein yang terbentuk. Berat molekul dapat dihitung dari logaritma jarak relatif pita protein *marker* dan sampel.

Penentuan *minimum inhibitory concentration* (MIC) fraksi pediosin

MIC diukur dengan mengacu pada Arief *et al.* (2013). MIC adalah konsentrasi minimum fraksi pediosin terpilih yang dapat menghambat 90% (1 log) pertumbuhan bakteri indikator. Fraksi pediosin terpilih diencerkan sebanyak 50; 60; 70; 80; dan 90% dengan *Nutrient Broth* (NB) (Oxoid, Canada) di dalam *microtube*, lalu diinokulasi dengan kultur *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang telah berumur 24 jam (suhu 37°C), dengan populasi bakteri 10^5 CFU/mL. Fraksi pediosin yang telah diinokulasi bakteri indikator tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri dihitung menggunakan metode hitungan cawan.

Pengaruh pediosin terhadap morfologi sel *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang diamati dengan *scanning electron microscope* (SEM)

Pengaruh pediosin terhadap morfologi sel *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang diamati dengan SEM mengacu pada Kaur *et al.* (2012) yang dimodifikasi. *L. monocytogenes* ATCC 7644 (populasi bakteri 10^5 CFU/mL) dipapar dengan fraksi pediosin terpilih pada konsentrasi 2 x MIC (Wang *et al.*, 2014) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Cairan disentrifugasi, pelet ditambah dengan glutaraldehid 2% b/v (Merck, Germany). Larutan disentrifugasi kembali dan ditambah dengan bufer $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ 0,2 M (pH 7,4) (Wako, Japan) dan OsO_4 1% (Merck, Germany) dalam bufer $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$ 0,2 M (pH 7,4). Sampel dikeringkan secara berturut-turut dengan etanol (70; 80; dan 95%) (Merck, Germany), dibekukan, lalu dikeringanginkan. Sampel kering dilapisi emas kemudian diamati di bawah SEM (JSM 5310 LV, JEOL, Japan) dengan perbesaran 10.000.

Analisis statistik

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan analisis sidik ragam (*one way analysis of variance*) menggunakan SPSS 20.0. Jika ada perbedaan nyata di antara perlakuan, maka digunakan uji beda nyata terkecil (BNT) sebagai uji lanjut dengan taraf uji $\alpha = 5\%$. Setiap pengujian diulang sebanyak dua kali dan pengukuran dilakukan secara duplo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antimikroba pada setiap tahap pemurnian

Aktivitas total SBS pediosin meningkat setelah diendapkan dengan amonium sulfat yang dilanjutkan dengan dialisis, tetapi aktivitasnya menurun setelah dimurnikan dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 (Tabel 1). Aktivitas total yang meningkat pada EKP hasil pengendapan amonium sulfat diikuti dengan dialisis kemungkinan disebabkan oleh adanya pemekatan protein, karena SBS pediosin sebelum tahap pemurnian masih mengandung media pertumbuhan yang tidak diinginkan dalam aplikasinya sebagai pengawet pangan (Garsa *et al.*, 2014a). Aktivitas total fraksi pediosin terpilih (F4) hasil pemurnian dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 menurun, kemungkinan diakibatkan sifat hidrofobisitas dari fraksi pediosin sehingga sulit berdifusi dalam media agar. Menurut Anastasiadou *et al.* (2008), sifat hidrofobisitas dari peptida dapat menghambat difusi bakteriosin pada media agar. Penurunan aktivitas total pediosin juga dilaporkan oleh Kingcha *et al.* (2012) dengan pediosin PA-1/AcH.

Kadar protein SBS menurun dengan adanya proses pemurnian. EKP hasil pengendapan dengan amonium sulfat yang diikuti dengan dialisis menurunkan total protein lebih dari setengahnya jika dibandingkan dengan SBS. Hal ini disebabkan oleh komponen yang memiliki berat molekul rendah (<2,0 kDa) terpisah pada tahap dialisis dengan membran *cut off* 2,0 kDa. F4 hasil pemurnian dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 juga mengalami penurunan jumlah protein karena SP Sephadex C-25 mampu mengikat protein yang bersifat kationik dan hidrofobik dari EKP sehingga protein yang bersifat anionik, kurang kationik, dan kurang hidrofobik dapat dielusikan dan dipisahkan berdasarkan variasi pH (Khan, 2012). Penurunan jumlah protein yang besar akibat tahap pemurnian yang sama, juga dilaporkan Kingcha *et al.* (2012) untuk pediosin PA-1/AcH dan Simha *et al.* (2012) untuk pediosin PA-1.

Aktivitas spesifik EKP meningkat setelah dilakukan pemurnian dengan pengendapan amonium sulfat yang diikuti dialisis jika dibandingkan SBS. Hal ini kemungkinan disebabkan EKP sudah tidak mengandung media pertumbuhan karena komponen pediosin lebih murni. Protein dan garam amonium sulfat yang berukuran kurang dari 2,0 kDa telah dipisahkan pada tahap dialisis oleh membran *cut off* 2,0 kDa (Ly dan Gabelli, 2014) sehingga EKP yang dihasilkan merupakan protein, polipeptida, dan peptida dengan berat molekul di atas 2,0 kDa, yang diperkirakan mengandung peptida pediosin.

Tabel 1. Pemurnian pediosin dari *P. pentosaceus* 2A2

Tahap Pemurnian	Volume (mL)	Aktivitas Total ^a (AUx10 ³)	Total Protein ^b (mg)	Aktivitas Spesifik ^c (AU/mg)	Rendemen ^d (%)	Kemurnian Relatif
Supernatan bebas sel (SBS)	300	1,72	20.439,00	0,08	100	1
Pengendapan amonium sulfat- dialisis (EKP)	160	2,04	5.132,80	0,40	53	5
Kromatografi pertukaran kation (F4) ^e	147	1,38	39,69	34,77	49	435

Keterangan: ^aPengukuran aktivitas total pediosin terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644 dengan metode cakram (Bhattacharya dan Das, 2010)= (luas zona bening-luas kertas cakram)/volume sampel (Abbasiliasi *et al.*, 2014); ^bPengukuran total protein menggunakan metode Lowry *et al.* (1951); ^cAktivitas spesifik= aktivitas total/total protein (Kingcha *et al.*, 2012); ^dRendemen= volume setelah pemurnian/volume sebelum pemurnian (Tiwari dan Srivastava, 2008); ^eFraksi hasil elusi bufer natrium asetat pada pH 7,0

Peningkatan yang tajam pada aktivitas spesifik hasil pemurnian menggunakan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 kemungkinan disebabkan pemisahan bertingkat yang terjadi pada SP Sephadex C-25, yaitu (1) peptida pediosin yang bersifat kationik, terpisah akibat terikat pada gugus fungsional sulfopropil yang bersifat anionik kuat, (2) ikatan gugus sulfopropil pada matriks yang berikatan silang dengan epiklorohidrin yang bersifat hidrofobik, menyebabkan terpisahnya peptida yang bukan hanya bersifat kationik saja, melainkan juga yang bersifat hidrofobik, (3) sifat dari Sephadex C-25 yang dapat memisahkan peptida berdasarkan berat molekulnya, yaitu di bawah 30 kDa yang memungkinkan pemisahan peptida pediosin yang bukan hanya bersifat kationik dan hidrofobik, tapi juga yang berukuran kecil (2,0-30,0 kDa) (Pharmacia Biotech, 2016).

EKP yang dilewatkan pada SP Sephadex C-25 dapat terpisah menjadi 4 fraksi, yaitu Fraksi 1 (F1), Fraksi 2 (F2), Fraksi 3 (F3), dan Fraksi 4 (F4). Fraksi-fraksi tersebut diuji aktivitas antimikrobanya, lalu diperoleh F4 yang memiliki zona hambat terbesar di antara fraksi pediosin lainnya (Tabel 2). F4 memiliki zona hambat yang lebih besar dari 2 mm. Mengacu pada Todorov *et al.* (2010), zona dianggap positif jika memiliki aktivitas antimikroba berdiameter di atas 2 mm.

Tabel 2. Zona hambat fraksi pediosin hasil pemisahan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644

Fraksi Pediosin*	Zona Hambat (mm)
F1	1,42±0,29 ^{ab}
F2	1,57±0,34 ^b
F3	1,13±0,22 ^a
F4	2,74±0,24 ^c

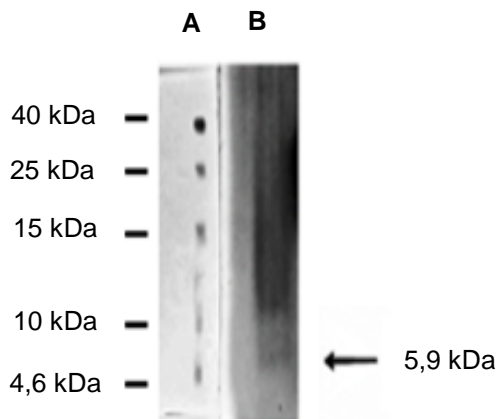
Keterangan: *Fraksi yang dielusi pada bufer pH 5,5 (F1), pH 6,0 (F2), pH 6,5 (F3), pH 7,0 (F4). Angka-angka yang diikuti oleh huruf berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

F4 ini merupakan fraksi yang terelusi paling akhir sehingga F4 merupakan fraksi yang bersifat paling kationik dan hidrofobik dibandingkan fraksi lainnya. Seperti yang dinyatakan Altuntas *et al.* (2010), pediosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus* spp. masuk ke dalam bakteriosin kelas IIa, yang menurut Elayaraja *et al.* (2014) merupakan peptida antimikroba yang bersifat kationik dan hidrofobik. Kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 telah berhasil memisahkan peptida yang bersifat anionik, kurang kationik, dan kurang hidrofobik, menjadi 3 fraksi yang terelusi pada awal. Hal ini menunjukkan keberhasilan pemurnian pediosin menjadi F4 yang lebih murni. Selanjutnya F4 ini dipilih sebagai fraksi yang dikarakterisasi karena memiliki zona hambat terbesar di antara fraksi lainnya.

Berat molekul fraksi pediosin terpilih

Berdasarkan Gambar 1, terlihat satu pita pada SDS-PAGE yang menunjukkan bahwa F4 pediosin (elusi bufer natrium asetat pH 7,0) memiliki berat molekul sekitar 5,9 kDa. Berdasarkan hasil penelitian lain, pediosin yang telah dimurnikan memiliki berat molekul yang bervariasi bergantung pada strain penghasilnya, yaitu pediosin PA-1 sebesar 4,6 kDa (Simha *et al.*, 2012; Sood *et al.*, 2013), pediosin PA-1/AcH sebesar 4,6 kDa (Devi dan Halami, 2011), serta bakteriosin dari *P. pentosaceus* ST44AM sebesar 6,5 kDa (Todorov dan Dicks, 2009).

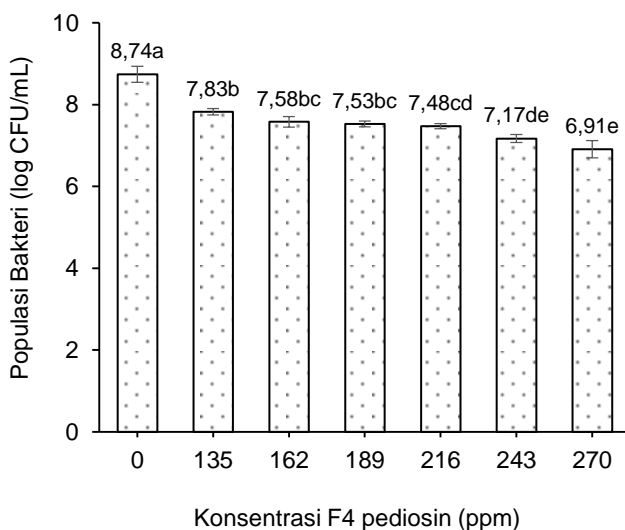
F4 memiliki berat molekul yang kecil (<10 kDa) sehingga pediosin ini termasuk ke dalam jenis bakteriosin kelas IIa, yaitu peptida antimikroba yang berukuran kecil, bersifat kationik, hidrofobik, stabil terhadap panas dan bersifat antilisteria kuat (Elayaraja *et al.*, 2014). Altuntas *et al.* (2010) juga menyatakan bahwa pediosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus* spp. masuk ke dalam bakteriosin kelas IIa seperti yang dijelaskan Elayaraja *et al.* (2014), dengan aktivitas antimikroba yang kuat terutama terhadap *L. monocytogenes*.



Gambar 1. SDS-PAGE dari F4 hasil pemisahan dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 (B) dibandingkan marker (A)

MIC fraksi pediosin terpilih

F4 dapat menurunkan populasi *L. monocytogenes* ATCC 7644 secara signifikan pada rentang konsentrasi 135-270 ppm jika dibandingkan dengan kontrol tanpa menggunakan pediosin (Gambar 2).



Keterangan: Notasi huruf yang berbeda pada diagram menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Gambar 2. Pengaruh konsentrasi F4 hasil pemisahan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25 terhadap populasi *L. monocytogenes* ATCC 7644

F4 dapat menurunkan populasi *L. monocytogenes* ATCC 7644 sebanyak 90% (1 log) pada konsentrasi sekitar 143 ppm (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa F4 memiliki efek antimikroba yang kuat dan lebih efektif hingga 48 kali dibandingkan EKP yang dilaporkan Mulyani (2019) dengan MIC

sebesar 6.828 ppm. Penurunan MIC F4 ini kemungkinan diakibatkan oleh adanya peningkatan kemurnian dari pediosin. F4 dapat dijadikan sebagai alternatif pengawet alami untuk menggantikan pengawet sintetik seperti natrium benzoat dan natrium nitrit, yang memiliki MIC terhadap *L. monocytogenes* berturut-turut adalah sebesar 200 ppm dan 100-150 ppm (Kashani *et al.*, 2012).

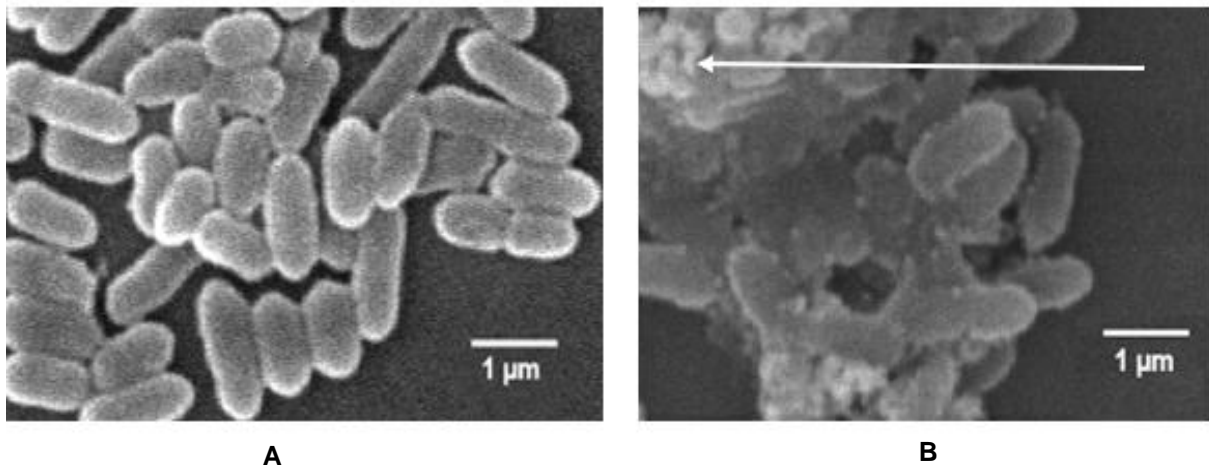
Pengaruh pediosin terhadap sel *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang diamati dengan SEM

Berdasarkan hasil pengamatan SEM pada Gambar 3 terlihat bahwa terjadi perubahan morfologi pada sel *L. monocytogenes* ATCC 7644 akibat dipapar dengan F4. Perubahan morfologi tersebut berupa pengecilan ukuran sel yang ditunjukkan dengan tanda panah. Diduga pengecilan ukuran sel ini diakibatkan sel yang mengalami lisis. Menurut Rodriguez *et al.* (2002), pediosin termasuk bersifat bakterisidal terhadap bakteri Gram positif yang sensitif. Dengan sifat hidrofobitasnya, paparan dengan pediosin menyebabkan membran bakteri menjadi tidak stabil sehingga sel mengalami lisis. Membran sitoplasma dari bakteri Gram positif merupakan target aksi pediosin (Papagianni dan Anastasiadou, 2009). Menurut Mehla dan Sood (2011b), peptida kationik dari pediosin berikatan dengan membran sel *L. monocytogenes* yang bersifat anionik (bermuatan negatif). Residu kationik pada N-terminal dari pediosin yang sebagian berbentuk struktur β -sheet dapat berikatan dengan permukaan membran sel target, sementara bagian hidrofobik dari C-terminal yang sebagian membentuk struktur heliks berpenetrasi pada bagian inti hidrofobik membran sel bakteri target (Nissen-Meyer *et al.*, 2009).

Hasil pengamatan SEM pada penelitian ini belum jelas menunjukkan adanya pembentukan pori seperti yang dilaporkan peneliti lainnya (Rodriguez *et al.*, 2002; Simha *et al.*, 2012). Hal ini diduga karena keterbatasan skala pembesaran alat SEM yang digunakan. Penelitian ini menggunakan perbesaran 10.000 kali sedangkan peneliti lain lebih dari 20.000 kali (Arief *et al.*, 2015a; Devi *et al.*, 2014; Jodoin dan Hincke, 2018).

KESIMPULAN

Pediosin dari *P. pentosaceus* 2A2 telah berhasil dimurnikan dengan metode pengendapan amonium sulfat yang diikuti dialisis dan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25. Hal ini terlihat dari peningkatan aktivitas spesifik terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644 hingga 5 kali lipat dengan pengendapan amonium sulfat yang diikuti dialisis kemudian meningkat tajam hingga 435 kali lipat setelah pemurnian dengan kromatografi pertukaran kation SP Sephadex C-25.



A

B

Keterangan: Tanpa F4 (A) dan dengan penambahan F4 sebanyak 2 x MIC (B). Tanda panah menunjukkan terjadinya pengecilan ukuran sel

Gambar 3. Analisis SEM pada perbesaran 10.000 terhadap *L. monocytogenes* ATCC 7644

Fraksi 4 (F4) pediosin merupakan fraksi terpilih dari hasil pemurnian dengan SP Sephadex C-25 yang memiliki zona hambat terbesar di antara fraksi-fraksi lainnya. Satu pita protein yang terbentuk pada hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa F4 memiliki berat molekul sekitar 5,9 kDa, MIC sebesar 143 ppm yang sebanding dengan MIC pengawet sintetik sehingga F4 berpotensi dijadikan sebagai pengganti pengawet sintetik. MIC ini dapat menurunkan populasi *L. monocytogenes* ATCC 7644 sebanyak 90% (1 log). Paparan F4 pada konsentrasi 2 x MIC terhadap sel *L. monocytogenes* ATCC 7644 yang diamati dengan SEM menunjukkan terjadinya perubahan morfologi sel berupa pengecilan ukuran sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, sesuai Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian Hibah Kompetensi Nomor: 079/SP2H/LT/DRPM/II/2017 tanggal 17 Februari 2017.

DAFTAR PUSTAKA

Abbasiliasi S, Tan JS, Ibrahim TAT, Kadkhodaei S, Ng HS, Vakhshiteh F, Ajdari Z, Mustafa S, Ling TC, Rahim RA, Ariff AB. 2014. Primary recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance derived from *Pediococcus acidilactici* Kp10 by an aqueous two-phase system. *Food Chem*

151: 93-100. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.019.

Altuntas EG, Cosansu S, Ayhan K. 2010. Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *Int J Food Microbiol* 141: 28-31. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.024.

Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P. 2008. Rapid quantifiable assessment of nutritional parameters influencing pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627. *Bioresour Technol* 99: 6646-6650. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.068.

Arief II, Jakaria, Suryati T, Wulandari Z, Andreas E. 2013. Isolation and characterization of plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* strains (IIA-1A5, IIA-1B1, IIA-2B2). *Media Peternakan* 2013: 91-100. DOI: 10.5398/medpet.2013.36.2.91.

Arief II, Budiman C, Jenie BSL, Andreas E, Yuneni A. 2015a. Plantaricin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Benef Microbes* 6: 603-613. DOI: 10.3920/BM2014.0064.

Arief II, Jenie BSL, Astawan M, Fujiyama K, Witarto AB. 2015b. Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian J Anim Sci* 9: 25-36. DOI: 10.3923/ajas.2015.25.36.

Bhattacharya S, Das A. 2010. Study of physical and cultural parameters on the bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Indian fermented foods. *Am J Food*

- Technol 5: 111-120. DOI: 10.3923/ajft.2010.111.120.
- Devi SM, Halami PM. 2011. Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria. *Curr Microbiol* 63: 181-185. DOI: 10.1007/s00284-011-9963-8.
- Devi SM, Ramaswamy AM, Halami PM. 2014. In situ production of pediocin PA-1 like bacteriocin by different genera of lactic acid bacteria in soy-milk fermentation and evaluation of sensory properties of the fermented soy curd. *J Food Sci Technol* 51: 3325-3332. DOI: 10.1007/s13197-012-0870-1.
- Elayaraja S, Neelamegam A, Packiyam M, Thangavel B. 2014. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J Trop Biomed* 4: 305-311. DOI: 10.12980/APJTB.4.2014C537.
- Garsa AK, Kumariya R, Sood SK, Kumar A, Kapila S. 2014a. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics Antimicrob Proteins* 6: 47-58. DOI: 10.1007/s12602-013-9153-z.
- Garsa AK, Kumariya R, Kumar A, Lather P, Kapila S, Sood SK. 2014b. Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. *Food Sci Technol* 59: 656-665. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.07.008.
- Hata T, Tanaka R, Ohmomo S. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int J Food Microbiol* 137: 94-99. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.021.
- Jodoin J, Hincke MT. 2018. Histone H5 is a potent antimicrobial agent and a template for novel antimicrobial peptides. *Sci Rep* 8: 1-15. DOI: 10.1038/s41598-018-20912-1.
- Kashani HH, Nikzad H, Mobaseri S, Hoseini ES. 2012. Synergism effect of nisin peptide in reducing chemical preservatives in food industry. *Life Sci J* 9: 496-501.
- Kaur G, Singh P, Malik RK, Bhardwaj A. 2012. Mechanism of nisin, pediocin 34, and enterocin FH99 resistance in *Listeria monocytogenes*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4: 11-20. DOI: 10.1007/s12602-011-9085-4.
- Khan HU. 2012. The role of Ion Exchange Chromatography in purification and characterization of molecules. <https://www.intechopen.com/books/ion-exchange-technologies/the-role-of-ion-exchange-chromatography-in-purification-and-characterization-of-molecules> [02 Agustus 2018].
- Kingcha Y, Tosukhowong A, Zendo T, Roytrakul S, Luxananil P, Chareonpornsook K, Valyasevi R, Sonomoto K, Visessanguan W. 2012. Antilisteria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control* 25: 190-196. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.005.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Ly KCD, Gabelli SB. 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol* 541: 85-94. DOI: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- Mehla J, Sood SK. 2011a. Acidic pH enhanced activity/yield of an YGNGV motif containing antimicrobial peptide isolated and purified from *Pediococcus pentosaceus* NCDC273, a dairy strain. *Int J Probiotics Prebiotics* 6: 81-88.
- Mehla J, Sood SK. 2011b. Substantiation in *Enterococcus faecalis* of dose-dependent resistance and cross-resistance to pore-forming antimicrobial peptides by use of a polydiacetylene-based colorimetric assay. *Appl Environ Microbiol* 77: 786-793. DOI: 10.1128/AEM.01496-10.
- Nissen-Meyer JN, Rogne P, Oppegard C, Haugen HS, Kristiansen PE. 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol* 10: 19-37. DOI: 10.2174/138920109787048661.
- Mulyani S, Jenie BSL, Kusumaningrum HD, Arief II. 2019. Characterisation of crude bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 2A2 in enriched molasses medium. *Int Food Res J* 26: 187-192.
- Papagianni M, Anastasiadou S. 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microb Cell Fact* 8: 1-16. DOI: 10.1186/1475-2859-8-3.
- Pharmacia Biotech. 2016. Sephadex ion exchange media. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm357/sephadex.pdf> [1 November 2016].
- Rodriguez JM, Martinez M, Kok J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42: 91-121. DOI: 10.1080/10408690290825475.

- Simha BV, Sood SK, Kumariya R, Garsa AK. 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiol Res* 167: 544-549. DOI: 10.1016/j.micres.2012.01.001.
- Sood SK, Simha BV, Kumariya R, Garsa AK, Mehla J, Meena S, Lather P. 2013. Highly specific culture-independent detection of YGNGV motif-containing pediocin-producing strains. *Probiotics Antimicro* 5: 37-42. DOI: 10.1007/s12602012-9114-y.
- Tiwari SK, Srivastava S. 2008. Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 759-767. DOI: 10.1007/s00253-008-1482-6.
- Todorov SD, Dicks LMT. 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from Marula (*Scerocarya birrea*). *Int J Food Microbiol* 132: 117-126. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.010.
- Todorov SD, Wachsmann M, Tome E, Dousset X, Destro MT, Dicks LMT, Franco BDGM, Velho MV, Drider D. 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol* 27: 869-879. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.001.
- Wang G, Feng G, Synder AB, Manns D, Churey JJ, Worobo RW. 2014. Bactericidal thurincin H causes unique morphological changes in *Bacillus cereus* F4552 without affecting membrane permeability. *FEMS Microbiol Lett* 357: 69-76. DOI: 10.1111/1574-6968.12486.