

MEKANISME AWAL DAN APLIKASI ANTIBAKTERI PEDIOSIN PaF-11 SEBAGAI PENGAWET TAHU

Tri Marwati¹, Irinne D.P², Nur Richana¹, Eni Harmayani², Endang S. Rahayu²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor

Jl. Tentara Pelajar No. 12 Bogor 16114

²Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Jl. Flora No. 1 Bulaksumur Yogyakarta

e-mail:watipasca@yahoo.com

Pediosin PaF-11 dari *Pediococcus acidilactici* F-11 merupakan peptida antibakteri yang aktif pada kisaran pH luas dan stabil pada perlakuan suhu tinggi dan rendah sehingga potensial digunakan sebagai pengawet tahu. Penelitian ditujukan untuk mengetahui mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri dan aplikasinya sebagai pengawet tahu. *P. acidilactici* F-11 dan *Lactobacillus pentosus* LB42 berturut turut digunakan sebagai bakteri penghasil dan indikator uji aktivitas pediosin PaF-11. Mekanisme awal kerja penghambatan pediosin PaF-11 ditentukan berdasar kajian pengaruh gadolinium (Gd^{3+}) terhadap aktivitas pediosin PaF-11, kadar Gd^{3+} pada dinding sel dan morfologi sel indikator. Uji aktivitas pediosin PaF-11 dilakukan dengan metode difusi agar sumur. Aplikasi pediosin PaF-11 dan bakteriosin komersial nisin dilakukan terhadap tahu produksi CV. Kitagama Yogyakarta. Perlakuan meliputi perendaman tahu dalam larutan nisin (500 IU/g, 1000 IU/g dan 2000 IU/g) dan larutan pediosin PaF-11 30 AU/g. Setelah perendaman, dilanjutkan dengan pasteurisasi pada suhu 90°C selama 10 menit dan penyimpanan pada suhu 4°C selama 16 hari. Tahu tanpa perendaman dalam larutan nisin dan pediosin PaF-11 digunakan sebagai kontrol. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri yaitu melalui interaksi pediosin PaF-11 yang bermuatan positif dengan asam teikoat dan asam lipoteikoat yang bermuatan negatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total bakteri awal pada tahu kontrol adalah 10^5 dan mengalami kenaikan menjadi 10^8 setelah disimpan. Penambahan larutan nisin dengan konsentrasi minimal 500 IU/g mampu menghambat populasi bakteri pada tahu sebesar 2 log cycle sedangkan larutan pediosin PaF-11(30 AU/g) mampu menghambat populasi bakteri pada tahu sebesar 0,5 log cycle.

Kata kunci : mekanisme awal antibakteri, pediosin PaF-11, *P. acidilactici* F-11 pengawet, tahu

ABSTRACT. Tri Marwati, Irinne, Nur Richana, Eni Harmayani and Endang S. Rahayu. 2012. **The Initial Mechanism and Application of Antibacterial Pediocin PaF-11 as Tofu Biopreservatives.** Pediocin PaF-11 from *Pediococcus acidilactici* F-11 is an antibacterial peptides, which is active in a wide range of pH and stable at high and low temperature treatment that could potentially be used as a tofu preservative. The aims of this research were to find out the pediocin PaF-11 mode of action and its application as tofu biopreservative. Partial purification of pediocin PaF-11 was done by the adsorption desorption methods and its activity was determined by well diffusion agar methods using *Lactobacillus pentosus* LB42 as indicator bacteria. The mode of action of pediocin PaF-11 was determined by evaluating the effect of gadolinium (Gd^{3+}) on the pediocin PaF-11 activity, the content of Gd^{3+} on the cell surface and the morphology of indicator cell. For the pediocin PaF-11 and nisin application, tofu from CV. Kitagama Yogyakarta were treated by 3 different concentrations of nisin (500 IU/g, 1000 IU/g and 2000 IU/g) and in pediocin PaF-11 AU/g, then pasteurized at 90°C for 10 minutes, and stored at 4°C for 16 days. Samples without nisin and pediocin PaF-11 addition were used as controls. Research results indicated that the initial mechanism of inhibition of pediosin PaF-11 as antibacterial through interaction of the pediocin PaF-11 having positive charge with teikoat acid and lipoteichoic acids which have negative charges on the surface of cell. Microbiological analysis showed that total bacteria in tofu without treatment increased from 10^5 to 10^8 after pasteurized and stored. Nisin treatment with minimal concentration of 500 IU/g reduced 2 log cycle of the total bacteria, and pediocin PaF-11 (30 AU/g) reduced 0,5 log cycle of total bacteria on tofu.

Key words : pediocin PaF-11, *P. acidilactici* F-11, biopreservative, tofu

PENDAHULUAN

Bakteriosin dikategorikan dalam empat klas sesuai sifat biokimia dan genetiknya. Klas I adalah Lantibiotik yang merupakan peptida termodifikasi pada proses post-translasi yang mengandung asam amino lantionin. Lantibiotik jenis A memiliki molekul panjang dengan

berat molekul < 4kDa, seperti nisin A dan nisin Z. Lantibiotik jenis B dengan struktur melingkar dan berat molekul 1,8-2,1 kDa seperti mersacidin dan actagardin. Bakteriosin Klas II yaitu protein bermolekul kecil (< 10 kDa), relatif tahan panas dan peptida pada sisi aktifnya tidak mengandung lantionin. Bakteriosin klas IIA (pediosin-pediocin like bacteriocin), seringkali disebut

sebagai antilisterial, dengan susunan asam amino antara 37 sampai 48 dan memiliki muatan positif. Bakteriosin kelas IIa memiliki konsensus sekuen YNGNV(X)C(X)4C(X)V(X)4A (X artinya asam amino apa saja). Bakteriosin kelas IIa yang telah banyak dipelajari yaitu pediosin PA-1 dan pediocin AcH. Bakteriosin kelas IIb (bakteriosin dua peptida) seperti plantaricin EF dan JK dan IIc (*non pediocin like bacteriocin*, bakteriosin satu peptida) seperti lactococcin 972. Bakteriosin kelas III adalah protein bermolekul besar (>30 kDa) yang sensitif terhadap panas seperti helveticin J dan millericin. Bakteriosin kelas IV, yaitu bakteriosin yang mengandung protein kompleks, terdiri atas komponen karbohidrat maupun lipid.

Pengetahuan tentang mekanisme antibakteri pediosin PaF-11 belum sepenuhnya diketahui. Pediosin SM-1, SA-1, P, O5-10 dan bakteriosin ST44AM bersifat bakterisidal^{1,2,3,4} sedangkan pediosin ST18 bersifat bakteriostatik⁵. Buchnerisin LB, plantaricin 423, pediosin AcH, bakteriosin HV219 merupakan bakteriosin yang memiliki mekanisme kerja dengan merusak permeabilitas membran sel⁶. Pada mekanisme ini, bakteriosin teradsorpsi oleh bakteri yang rentan pada reseptor yang spesifik, selanjutnya terjadi perubahan permeabilitas dan integritas membran menyebabkan sel kehilangan kemampuannya untuk membelah diri dan terjadi lisis⁷.

Komponen molekul anion pada permukaan bakteri Gram positif yang berperan penting dalam interaksi awal bakteriosin bermuatan positif (kation) dengan sel indikator adalah asam teikoat dan asam lipoteikoat^{7,8}. Pendapat yang sama diungkapkan juga Miller⁹ untuk mekanisme penghambatan pediosin AcH terhadap *Listeria*, yaitu pediosin AcH berinteraksi dengan asam lipoteikoat atau asam teikoat.

Mekanisme kerja pediosin dapat diketahui antara lain dari kajian faktor yang berpengaruh terhadap aktivitasnya sebagai antibakteri, diantaranya yaitu ion positif tervalensi gadolinium (Gd^{3+}). Ion Gd^{3+} menghambat aktivitas nisin Z terhadap bakteri *L. monocytogenes*. Nisin Z memiliki struktur mirip dengan nisin A, kecuali residu histidin digantikan dengan residu arsenin. Target dari aktivitas nisin A adalah membran sitoplasma dan diikuti dengan pembentukan pori. Nisin berinteraksi dengan muatan negatif dari fosfolipid¹⁰. Ion Gd^{3+} mempunyai efek penghambatan terhadap aktivitas pediosin PD-1. Penambahan ion Gd^{3+} mencegah pembentukan pori oleh pediosin dan bahkan menutup pori jika ditambahkan setelah pori terbentuk. Ion Gd^{3+} dapat menempel pada muatan negatif dari kelompok permukaan fosfolipid dalam membran sitoplasma dan dapat menghalangi interaksi elektrostatis antara pediosin dan lipid anion¹¹. Netralisasi muatan positif menyebabkan

kondensasi fosfolipid dan menyebabkan membran lebih rigid¹² sehingga menurunkan efisiensi masuknya nisin Z dan pediosin PD-1 dan mencegah terbentuknya pori.

Aktivitas antibakteri seringkali diamati dari perubahan morfologi sel target. Hasil *scanning electron microscope* (SEM) sel *S. aureus* menunjukkan dengan perlakuan antibakteri nisin maka sel mengalami kerusakan, yaitu terjadi permeabilisasi (depolarisasi) membran sitoplasma¹³. Hasil SEM sel *L. Monocytogenes* Scott A, *S. typhimurium* MH2413 dan *E. coli* O157 menunjukkan bahwa perlakuan dengan nisin dan pediosin menyebabkan dinding sel dan membran sel rusak dan terjadi lisis¹⁴.

Tahu memiliki pH sekitar 5-6, a_w 0,98-0,99 dengan kadar proteinnya yang tinggi antara 9 – 14 %. Karakteristik ini mengakibatkan tahu mudah mengalami kerusakan akibat aktivitas mikrobia pembusuk yang terdapat pada tahu seperti bakteri mesofilik, psikotropik dan psikofilik selama penyimpanan. Pada tahu ditemukan bakteri *Enterobacteriaceae*, bakteri asam laktat, *Escherichia coli* dan *Yersinia enterocolitica*¹⁵ coliform, bakteri pembentuk spora dan yeast¹⁶; *Enterobacteria*, *Pseudomonas spp.* dan *Bacillus spp.*¹⁷. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*¹⁸; *Bacillus sp.* (S08), *B. megaterium* (S10), *B. cereus* (S17, S27, S28, S32) dan *Enterobacter sakazakii* (S35)¹⁹. Oleh karena itu, perlu upaya untuk menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk pada tahu selama masa penyimpanan menggunakan pengawet yang sesuai dengan karakteristik tahu.

Permintaan konsumen akan pangan natural yang dengan kualitas fisik, kimia, mikrobiologi dan organoleptik tinggi mendorong berkembangnya bahan pengawet bakteriosin. Mengingat dalam pengolahan pangan sering melibatkan suhu tinggi, suhu rendah, dan penyimpanan yang lama maka diperlukan bakteriosin dengan karakteristik yang tepat. Pediosin PaF-11 merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* F11 yang bersifat antibakteri terhadap bakteri pembusuk berkekerabatan dekat dan dengan karakteristik antara lain aktif pada kisaran pH luas dan stabil pada perlakuan suhu tinggi dan rendah sehingga potensial digunakan sebagai pengawet tahu. Oleh karena itu maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri dan aplikasinya sebagai pengawet tahu.

Berdasar kajian pustaka bahwa ion logam positif Gd^{3+} mengikat muatan negatif reseptor^{10,20} dan komponen molekul anion pada permukaan bakteri Gram positif yang berperan penting dalam interaksi awal bakteriosin bermuatan positif (kation) dengan sel indikator adalah asam teikoat dan asam lipoteikoat^{7,8}

serta mekanisme penghambatan pediosin AcH terhadap *Listeria* diawali dengan interaksi antara pediosin AcH dengan asam lipoteikoat atau asam teikoat⁸ maka hipotesis yang diajukan yaitu bahwa mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri adalah melalui interaksi pediosin PaF-11 dengan asam lipoteikoat dan asam teikoat. Selanjutnya, berdasar karakteristik pediosin PaF-11 yang bersifat antibakteri terhadap bakteri pembusuk dan stabil pada suhu tinggi dan rendah serta pH yang luas, maka hipotesa kedua yaitu bahwa pediosin PaF-11 mampu menghambat bakteri dalam tahu dipasteurisasi dan disimpan dingin (4°C) dan memperpanjang masa simpannya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kultur *Pediococcus acidilactici* F-11 dan *Lactobacillus pentosus* LB42 masing masing digunakan sebagai bakteri penghasil dan indikator uji aktivitas pediosin PaF-11. Kedua kultur bakteri tersebut diperoleh dari *Food and Nutrition Culture Collection* (FNCC), Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Untuk pemeliharaan kultur bakteri penghasil dan produksi pediosin PaF-11 digunakan media TGE (*Tryptone, Glucose, Yeast Extract*) cair pH 6,5 dengan komposisi²¹ sebagai berikut : 1% tripton, 1% glukosa, 1% ekstrak yeast, 0,2% tween, 0,005% (0,033mM) $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,0056% (0,02mM) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Pada pengujian aktivitas pediosin PaF-11 digunakan media TGE agar lunak dan keras, dengan komposisi²¹ sama dengan media TGE cair ditambah agar 0,75% dan 1,5%. Sedangkan untuk purifikasi pediosin PaF-11 digunakan NaOH, Na_2HPO_4 , NaCl, dan HCl²⁰. Bahan kimia lain yang digunakan yaitu gadolinium²⁰ untuk studi mekanisme penghambatan dan nisin (Nisaplin)²⁰ sebagai kontrol positif bakteriosin.

Metode Penelitian

Pembuatan Stock Kultur Inokulum dan Kultur Kerja *Pediococcus acidilactici* F-11

Pembuatan stok kultur bakteri *P. acidilactici* F-11 dilakukan dengan menambahkan 10% susu skim dan 20% gliserol steril pada massa sel hasil sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Campuran tersebut dikocok sampai homogen kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan disimpan pada suhu -20°C. Sebelum digunakan, dilakukan peremajaan kultur pada media TGE cair dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pembuatan inokulum dimulai dengan volume yang paling kecil yaitu menumbuhkan *P. acidilactici* F-11 pada media TGE 5 ml, inkubasi selama 24 jam pada

suhu 37°C. Selanjutnya secara bertahap digunakan untuk inokulasi ke media TGE dengan volume yang lebih tinggi.

Produksi dan Purifikasi Pediosin PaF-11

Untuk produksi pediosin PaF-11, 1 % inokulum *P. acidilactici* F-11 ditumbuhkan dalam media TGE cair^{21,22} dengan volume 500 ml, pH 6,5 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Purifikasi pediosin PaF-11 dilakukan dengan metode adsorpsi desorpsi yang dikembangkan Yang *et al*²³. Kultur *P. acidilactici* F-11 yang telah diinkubasi selama 18 jam dipanaskan selama 30 menit untuk mematikan sel dan merusak aktivitas enzim proteolitik. Selanjutnya dilakukan adsorpsi pada pH 6,5 yang diatur menggunakan 10 mM NaOH. Kemudian dilakukan stiring pada 4°C selama 24 jam kemudian sentrifugasi 15.000 x g selama 15 menit²² untuk mendapatkan endapan (mengandung sel dan pediosin). Endapan selanjutnya dicuci dengan 2 mM Na_2HPO_4 dan resuspensi dengan 0,1M NaCl (250 ml). Proses selanjutnya yaitu desorpsi pada pH 2,0; dengan pengaturan pH menggunakan HCl. Untuk membantu proses desorpsi, dilakukan stiring pada suhu 4°C selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 29.000 x g selama 30 menit, hingga diperoleh supernatan yang mengandung pediosin. Supernatan dinetralkan dengan 10 mM NaOH dan ditambahkan 0,1M NaCl hingga total volume supernatan menjadi 250 ml. Percobaan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

Uji Aktivitas Pediosin PaF-11

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar dikembangkan Biswas *et al*²¹ menggunakan strain indikator *L. pentosus* LB42. Dipersiapkan 5 ml media TGE agar keras (50°C) dituangkan ke dalam cawan Petri dan dibiarkan memadat. Setelah media memadat dituang sebanyak 4 ml media TGE semi padat yang telah diinokulasi dengan bakteri *L. pentosus* LB42 berumur 18 jam sebanyak 40 µl dan didiamkan pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya dibuat sumuran. Untuk pengujian secara kuantitatif, dilakukan seri pengenceran terhadap larutan pediosin PaF-11 yang akan diuji aktivitas penghambatannya dengan menggunakan aquadest steril. Masing-masing seri pengenceran pediosin PaF-11, sebanyak 20 µl dimasukkan ke dalam sumuran, dan disimpan pada suhu 4-5°C minimal selama 1 jam agar larutan bakteriosin terdifusi kedalam media agar. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati zona penghambatannya. Aktivitas penghambatan dinyatakan dengan dalam arbitrary units per ml (AU/ml)²⁴. Satu AU didefinisikan sebagai faktor pengenceran

tertinggi yang masih menunjukkan zona jernih hambatan pertumbuhan strain indikator. Misalnya pada penelitian ini pengenceran tertinggi yang masih memberikan zona jernih adalah $20 \times$ maka besarnya aktivitas antibakteri adalah $1000/20 \mu\text{l} \times 20 = 1000\text{AU/ml}$. Uji aktivitas dilakukan dengan tiga kali ulangan.

Pengaruh Gadolinium terhadap Aktivitas Pediosin PaF-11

Studi mekanisme penghambatan melalui kajian pengaruh penambahan gadolinium terhadap aktivitas pediosin PaF-11 mengacu pada metode Bauer *et al.*²⁰ dengan modifikasi. Bakteri indikator sel *L. pentosus* LB42 ditumbuhkan sampai fase pertengahan eksponensial dan dipersiapkan enam suspensi sel masing-masing 10 ml. Bakteri *L. pentosus* LB42 tersebut memiliki populasi $6,1 \times 10^9$ CFU/ml. Konsentrasi pediosin PaF-11 dan nisin yang digunakan masing-masing 1 MIC/ml. 1 MIC didefinisikan sebagai konsentrasi pengenceran tertinggi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi gadolinium yang ditambahkan adalah 2mM. Perlakuan enam variasi suspensi sel bakteri indikator, yaitu (1) kultur sel *L. pentosus* LB42, (2) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah pediosin PaF-1, (3) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah pediosin PaF-11 dan gadolinium, (4) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah gadolinium, (5) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah nisin dan (6) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah nisin dan gadolinium. Kultur sel dengan gadolinium dibiarkan kontak selama 10 menit sebelum dilakukan penambahan pediosin PaF-11 maupun nisin. Parameter yang diamati yaitu *optical density sel* pada jam ke 0 dan setelah 3 jam inkubasi yang diukur pada 600 nm. Percobaan dilakukan dengan dua kali ulangan.

Pengaruh Gadolinium terhadap Kadar (Gd^{3+}) pada Permukaan Sel *Lactocacillus pentosus* LB42

Kultur sel dan kadar gadolinium yang digunakan pada percobaan ini mengacu pada metode Bauer *et al.*²⁰ dengan modifikasi. Dipersiapkan tiga variasi kultur bakteri indikator, yaitu (1) kultur *L. pentosus* LB42, (2) kultur *L. pentosus* LB42 ditambah pediosin PaF-11, dan (3) kultur *L. pentosus* LB42 ditambah pediosin PaF-11 dan gadolinium. Konsentrasi pediosin PaF-11 yang digunakan yaitu 1 MIC/ml, sedangkan gadolinium yang ditambahkan adalah 2mM. Suspensi sel dengan gadolinium dibiarkan kontak selama 10 menit sebelum dilakukan penambahan pediosin PaF-11. Selanjutnya dilakukan analisis kadar gadolinium pada permukaan sel menggunakan *Scanning Electron Microscopy Energy Dispersive Spectrometry* (SEM EDS). Percobaan dilakukan dengan dua kali ulangan.

Pengaruh Penambahan Pediosin PaF-11 terhadap Morfologi Sel *Lactocacillus pentosus* LB42

Kultur sel yang digunakan pada percobaan ini mengacu pada metode Bauer *et al.*²⁰ dengan modifikasi. Dipersiapkan dua suspensi sel *L. pentosus* LB42 masing-masing 10 ml dengan perlakuan sebagai berikut : (1) kultur sel *L. pentosus* LB42, (2) kultur sel *L. pentosus* LB42 ditambah pediosin PaF-11. Pada percobaan ini dipelajari perubahan morfologi sel *L. pentosus* LB42 akibat pengaruh pediosin PaF-11 dengan metode mikroskopis menggunakan mikroskop elektron yaitu *Scanning Electron Microscopy* (SEM)^{13,14}. Percobaan dilakukan dengan dua kali ulangan.

Aplikasi Nisin dan Pediosin PaF-11 pada Tahu a. Persiapan larutan nisin dan pediosin PaF-11

Pada penelitian ini digunakan nisin dengan aktivitas 500 IU/ml, 1000 IU/ml dan 2000 IU/ml. Larutan nisin 500 IU/g tahu disiapkan dengan mencampur 250 mg Nisaplin dalam 50 ml air. Maka dalam larutan tersebut terdapat 5×10^6 IU/l atau setara dengan 5000 IU/ml. Kemudian 50 ml larutan nisin ditambahkan ke dalam 500 g tahu dalam plastik. Maka konsentrasi akhir menjadi 500 IU/g tahu. Larutan nisin 500 IU/g tahu disiapkan dengan mencampur 250 mg Nisaplin dalam 50 ml air. Maka dalam larutan tersebut terdapat 5×10^6 IU/l atau setara dengan 5000 IU/ml. Kemudian 50 ml larutan nisin ditambahkan ke dalam 500 g tahu dalam plastik. Maka konsentrasi akhir menjadi 500 IU/g tahu. Larutan nisin 1000 IU/g tahu disiapkan dengan mencampur 500 mg Nisaplin dalam 50 ml air. Maka dalam larutan tersebut terdapat 80×10^6 IU/l atau setara dengan 10000 IU/ml. Kemudian 50 ml larutan nisin ditambahkan ke dalam 500 g tahu dalam plastik. Maka konsentrasi akhir menjadi 1000 IU/g tahu. Larutan nisin 2000 IU/g tahu disiapkan dengan mencampur 1000 mg Nisaplin dalam 50 ml air. Maka dalam larutan tersebut terdapat 20×10^6 IU/l atau setara dengan 20000 IU/ml. Kemudian 50 ml larutan nisin ditambahkan ke dalam 500 g tahu dalam plastik. Maka konsentrasi akhir menjadi 2000 IU/g tahu. Larutan nisin disiapkan dengan menggunakan air mentah. Larutan pediosin 30 AU/g disiapkan dari 50 ml pediosin dengan aktivitas 300AU/ml.

b. Aplikasi larutan nisin dan pediosin PaF-11

Tahu dikemas menggunakan kemasan plastik polipropilen 0,05 mm dengan ukuran 23 cm x 16 cm, lalu diberi penambahan nisin 3 variasi konsentrasi, 500, 1000 dan 2000 IU/g dan pediosin PAF-11 (30 AU/g). kemudian ditutup rapat. Setelah proses pengemasan selesai, tahu diberi perlakuan pasteurisasi. Tahu tanpa penambahan nisin pasteurisasi disimpan dingin digunakan sebagai

kontrol. Pasteurisasi dilakukan pada suhu 90°C selama 10 menit. Seluruh tahu disimpan pada suhu (4°C) dan diuji sifat mikrobiologis selama 16 hari. Percobaan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

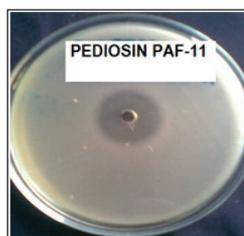
HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi dan Purifikasi Pediosin PaF-11

Pediosin PaF-11 merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* F-11. Sintesa pediosin PaF-11 terjadi pada awal fase eksponensial sampai fase stasioner dengan peningkatan aktivitas pediosin PaF-11 terjadi setelah 8 jam dan stabil sampai 16 jam inkubasi²⁵. Purifikasi pediosin PaF-11 dilakukan dengan metode adsorpsi desorpsi tanpa penambahan biomassa sel mati, dengan kondisi pH adsorpsi 6,5 dan desorpsi 2,0. Zona hambat terhadap *L. pentosus* terlihat pada Gambar 2. Dari hasil pengujian difusi agar terlihat adanya zona jernih di sekitar lubang sumuran dengan pinggiran (bentuk lingkaran) yang jelas yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan oleh pediosin. Kuantifikasi aktivitas penghambatan pediosin PaF-11 dilakukan dengan uji aktivitas dengan metode difusi agar sumur dengan beberapa kali pengenceran. Aktivitas penghambatan dinyatakan dengan dalam arbitrary units per ml (AU/ml)²⁴. Pada penelitian ini pengenceran tertinggi yang masih memberikan zona jernih adalah 30x maka besarnya aktivitas antibakteri adalah $1000/20 \mu\text{l} \times 20 = 1500\text{AU/ml}$ ²⁵.

Pengaruh Penambahan Gadolinium terhadap Aktivitas Pediosin PaF-11

Dari parameter densitas optik sel indikator setelah perlakuan (Tabel 1) diketahui bahwa penambahan pediosin PaF-11 menurunkan nilai densitas optik dari nilai 1,41 untuk sel tanpa perlakuan menjadi 0,99 dan 0,80 berturut turut akibat penambahan pediosin dan nisin. Penurunan nilai densitas optik tersebut menunjukkan



Gambar 1. Uji difusi agar untuk mendeteksi aktivitas pediosin PAF-11 menggunakan bakteri indikator *L. pentosus* LB42

Figure 1. Agar diffusion bioassay for detection of pediocin PaF-11 activity using *L. pentosus* LB42 as an indicator

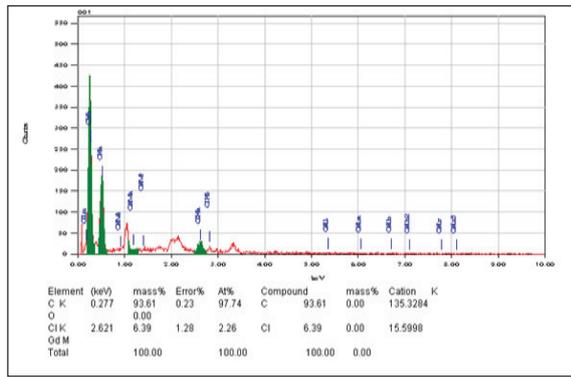
adanya aktivitas penghambatan antibakteri dari pediosin dan nisin. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Chun dan Hancock¹³ bahwa dengan penambahan bakteriosin nisin maka sel *S. aureus* mengalami perubahan densitas optik.

Dari Tabel 1 terlihat pula bahwa dengan penambahan gadolinium bersama sama dengan pediosin PaF-11 atau nisin maka nilai densitas optiknya sel lebih tinggi dari pada dengan penambahan pediosin PaF-11 atau nisin aja. Hal ini menunjukkan bahwa gadolinium menurunkan aktivitas pediosin PaF-11 dan nisin dalam menghambat pertumbuhan *L. pentosus* LB42. Hasil ini mengindikasikan bahwa penambahan gadolinium diduga menetralkan muatan negatif reseptor asam teikoat dan asam lipoteikoat^{7,8}. Hal ini sesuai pula dengan hasil penelitian Abee¹⁰ bahwa ion logam positif seperti Mg^{2+} , Ca^{2+} dan Gd^{3+} mengikat muatan negatif fosfatidilgliserol dan kardiopolin pada membran sitoplasma *L. monocytogenes* sehingga aktivitas antimikrobia nisin Z menurun. Netralisasi muatan negatif tersebut memicu terjadinya kondensasi lipid sehingga membran sel menjadi lebih rigid²⁰ sehingga menurunkan efisiensi masuknya pediosin PaF-11 dan terbentuknya pori.

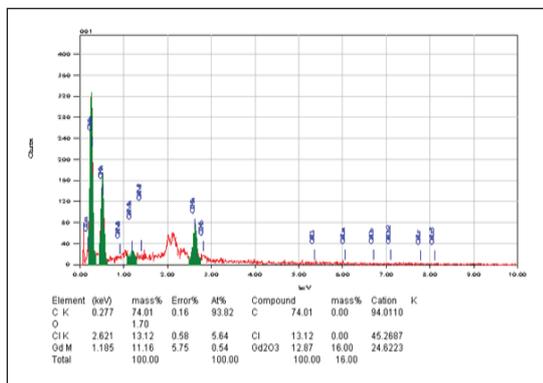
Tabel 1. Pengaruh gadolinium terindikasi dari perubahan densitas optik kultur *L. pentosus* LB 42

Table 1. Effect of gadolinium as indicated by changes in optical density of *L. pentosus* LB 42 culture

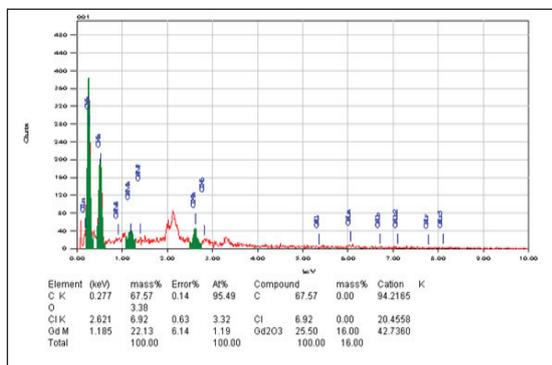
Nomor/ Number	Perlakuan/ Treatment	Densitas optik awal/ Initial optical density	Densitas optik setelah 3 jam perlakuan/ Optical density after 3 hours treatment
1.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42	0,78	1,41
2.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42 + pediosin PaF-11	0,78	0,99
3.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42 + pediosin PaF-11 + 2 mM Gd^{3+}	0,78	1,17
4.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42 + 2 mM Gd^{3+}	0,78	1,07
5.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42 + nisin	0,78	0,80
6.	Kultur sel <i>L. pentosus</i> LB 42 + nisin + 2 mM Gd^{3+}	0,78	0,96



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Kromatogram SEM EDS sel *L. pentosus* LB42 (a) sel *L. pentosus* LB42 (b) sel *L. pentosus* LB42 + pediosin PaF-11 (c) Sel *L. pentosus* LB42 + pediosin PaF-11 +Gd3+.

Figure 2. SEM EDS Chromatogram of *L. pentosus* LB42 cell (a) *L. pentosus* LB42 cell (b) *L. pentosus* LB42 cell + pediocin PaF-11 (c) *L. pentosus* LB42 cell + pediocin PaF-11 +Gd3+

Indikasi tersebut didukung data dari sekuen asam amino pediosin PaF-11²⁶. Diketahui bahwa pediosin PaF-11 mengandung sejumlah asam amino hidrofobik sebagai berikut : metionin, isoleusin, leusin, alanin, tirosin, valin, dan triptofan²⁶. Residu hidrofobik tersebut memfasilitasi jalannya interaksi dengan reseptor protein pada sel target. Kontak molekul hidrofobik dengan membran sitoplasma sel sensitif akan membuat destabilisasi fungsi membran, selanjutnya terjadi kehilangan permeabilitas dan lisis sel²⁷. Hal yang sama secara spesifik telah dilaporkan sebelumnya bahwa pediosin menyebabkan hilangnya K⁺ intraseluler, masuknya laktosa dari medium ke dalam sel dan pada beberapa strain menyebabkan sel lisis, yang mengindikasikan adanya destabilisasi fungsi membran^{7,28}. Pediosin didapatkan terikat dengan reseptor pada permukaan sel sensitif⁷.

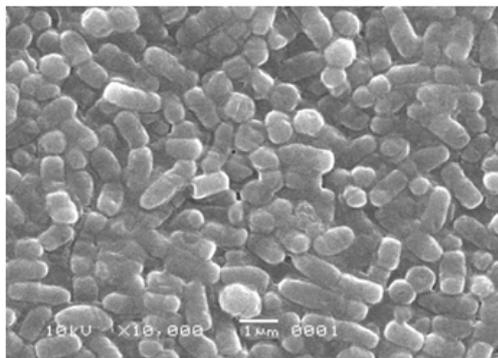
Pengaruh Gadolinium terhadap Kadar (Gd³⁺) pada Dinding Sel *Lactocacillus pentosus* LB42

Kadar gadolinium pada permukaan bakteri indikator *L. pentosus* LB42 yang ditambahkan gadolinium adalah 22,13 %, sedangkan pada sel *L. pentosus* LB42 yang ditambahkan gadolinium dan pediosin PaF-11 memiliki kadar gadolinium lebih rendah yaitu 11,16 % (Gambar 2). Dari perbedaan kadar gadolinium tersebut dapat diduga bahwa tanpa pediosin PaF-11 maka kemampuan permukaan sel dalam mengikat ion gadolinium adalah lebih besar dibandingkan dengan adanya pediosin PaF-11, yang menunjukkan adanya kompetisi antara gadolinium dan pediosin PaF-11. Hasil ini mengindikasikan bahwa penambahan gadolinium diduga menetralkan muatan negatif asam teikoat pada permukaan sel *L. pentosus* LB42. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Bauer¹¹ yaitu bahwa ion Gd³⁺ dapat menempel pada muatan negatif dari kelompok permukaan fosfolipid dalam membran sitoplasma dan dapat menghalangi interaksi elektrostatis antara pediosin dan lipid anion¹¹ dan menetralkan muatan sesuai penelitian Harwood, J.L., Russel¹².

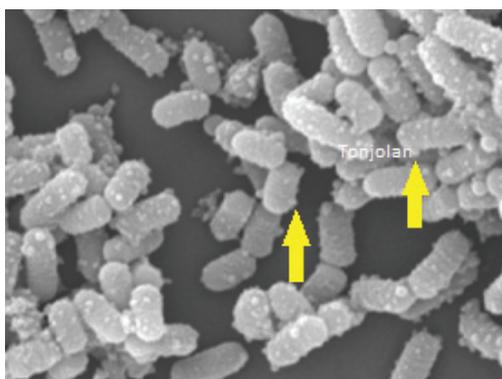
Pengaruh Penambahan Pediosin PaF-11 terhadap Morfologi *Lactobacillus pentosus* LB 42

Scanning Electron Microscope sel *L. pentosus* LB42 pengaruh dari pediosin dan gadolinium terlihat pada Gambar 3. Pada Gambar tersebut terlihat adanya perubahan morfologi sel *L. pentosus* LB42 yaitu dari sel yang sehat terlihat memiliki dinding sel yang halus, tetapi dengan adanya penambahan pediosin, maka terbentuk tonjolan kecil pada permukaan sel. Hasil ini sesuai yang dilaporkan Chun *et al.*¹³ dan Kalchayanand *et al.*¹⁴.

Komponen molekul pada permukaan bakteri Gram positif yang bertindak sebagai reseptor adalah asam teikoat dan asam lipoteikoat^{7,8,9}. Dengan demikian maka



(a)



(b)

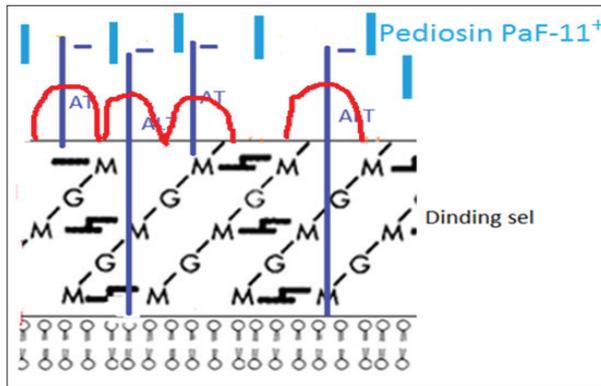
Gambar 3. Gambar SEM sel *L. pentosus* LB42 (a) sel *L. pentosus* LB42 (b) sel *L. pentosus* LB42 + pediosin PaF-11

Figure 3. SEM Image of *L. pentosus* LB42 cell (a) *L. pentosus* LB42 cell (b) *L. pentosus* LB42 cell + pediosin PaF-11

diduga bahwa terbentuknya tonjolan pada permukaan sel disebabkan karena pediosin PaF-11 berinteraksi dengan asam teikoat dan asam lipoteikoat. Terbentuknya tonjolan tersebut merupakan tahap awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri. Mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri dapat dilihat pada Gambar 4.

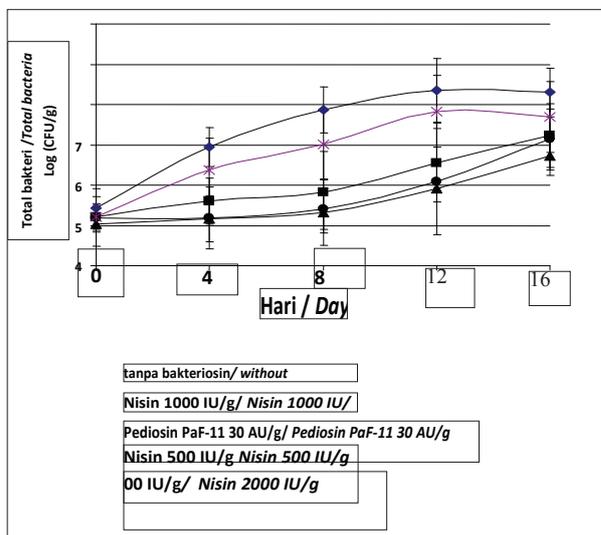
Pengaruh Pediosin PaF-11 dalam menghambat Pertumbuhan Bakteri pada Tahu

Kemampuan nisin dan pediosin PaF-11 dalam menghambat populasi bakteri pada tahu yang disimpan dingin terlihat pada Gambar 5. Total bakteri awal pada tahu yang dipasteurisasi 90°C selama 10 menit adalah 10⁵ dan mengalami kenaikan menjadi 10⁸ setelah disimpan. Penambahan nisin dengan konsentrasi minimal 500 IU/g mampu menghambat populasi bakteri pada tahu sebesar 2 log cycle sedangkan pediosin PaF-11(30 AU/g) mampu menghambat populasi bakteri pada tahu sebesar 0,5 log cycle.



Gambar 4. Skema mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri.

Figure 4. Schema of the initial mechanism of pediosin PaF-11 antibacterial inhibition



Gambar 5. Pengaruh nisin dan pediosin PaF-11 terhadap pertumbuhan mikrobia dalam tahu yang di dipasteurisasi dan disimpan Dingin (4°C)

Figure 5. Effect of nisin and pediocin PaF-11 on microbes grown in pasteurized and refrigerated tofu (4°C) .

Bakteri yang mendominasi pada tahu dipasteurisasi kemudian disimpan dingin adalah bakteri jenis psikrotropik termotoleran, yaitu jenis yang tahan terhadap suhu pasteurisasi dan dapat melakukan metabolisme pada suhu dingin. Jenis bakteri ini antara lain *Lactobacillus*, *Clostridium spp.* dan *Bacillus*. *Lactobacillus*, *Bacillus* dan *Clostridium* merupakan bakteri Gram positif yang dapat menghasilkan lendir. Selain menghasilkan lendir, *Lactobacillus* juga dapat menghasilkan gas. *Bacillus* dan *Clostridium* dapat membentuk spora yang tahan terhadap panas dan dapat tumbuh selama penyimpanan. Penghambatan pertumbuhan bakteri pada tahu ini dapat terjadi karena

pediosin tetap aktif pada suhu panas dan dingin, dan adanya proses pasteurisasi dan penyimpanan suhu dingin yang mengakibatkan sel bakteri Gram negatif mengalami *sub lethal injury* menjadi lebih sensitif terhadap pediosin PaF-11.

KESIMPULAN

Pediosin PaF-11 yang diproduksi menggunakan media TGE dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam dan dipurifikasi pada pH adsorpsi 6,5 dan desorpsi 2,0 memiliki aktivitas antibakteri 1500 AU/ml.

Penambahan gadolinium dan pediosin PaF-11 secara bersama-sama pada inkubasi sel indikator *L. pentosus* LB42 menyebabkan penurunan aktivitas pediosin PaF-11 dan kadar gadolinium (Gd³⁺) pada permukaan sel. Aplikasi pediosin PaF-11 menyebabkan terbentuknya tonjolan kecil pada permukaan sel *L. pentosus* LB42. Mekanisme awal penghambatan pediosin PaF-11 sebagai antibakteri yaitu melalui interaksi pediosin PaF-11 yang bermuatan positif dengan asam teikoat dan asam lipoteikoat yang bermuatan negatif.

Penambahan nisin dengan konsentrasi minimal 500 IU/g mampu menghambat populasi bakteri pada tahu yang disimpan dingin (4°C) selama 16 hari sebesar 2 *log cycle*. Sedangkan pediosin PaF-11 dengan aktivitas sebesar 30 AU/g mampu menghambat populasi bakteri pada tahu yang disimpan dingin (4°C) sebesar 0,5 *log cycle*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. *Enzyme Microb Technol.* 2008a; 43:448-454.
- Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technol.* 2008b; 99:5384–5390.
- Huang TC, Fu HY, Ho CT. Comparative Studies on Some Quality Attributes of Firm Tofu Sterilized with Traditional and Autoclaving Methods. *J. of Agric and Food Chem.* 2003; 51 (1):254–259.
- Todorov SD, Dicks LMT. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *Int. J. Food Microbiol.* 2009; doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.010
- Todorov SD, Dicks LMT, Pediocin ST18, an antilisterial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process of Biochemistry.* 2005; 40: 365–370.
- Todorov SD, Dicks LMT. Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. *Biotechnology Journal.* 2006; 1: 405-409.
- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B, Kalchayanad N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. of Applied Bacteriology* 1991. 70:23-25.
- Jack RW, Carne A, Metzger J, Stefanovic S, Sahl HG, Jung J, Tagg JR. Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur. J. Biochem.* 1994; 220:455–462.
- Mechanism of action of pediocin AcH against *Listeria* cells [Internet]. 2012. [Diunduh tanggal 2 Desember 2012]. Tersedia di <http://www.uwyo.edu/molecbio/faculty-and-staff/kurt-miller.html>
- Abee T, Rombouts FM, Hugenholtz J, Guihard G, Letellier L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(6): 1962–1968.
- Bauer R. Strategies for the control of malolactic fermentation: characterization of pediocin PD-1 and the gene for the malic enzyme from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. [Dissertation]; Stellenbosch University, South Africa. 2003.
- Harwood JL, Russel NJ. Lipids in plants and microbes. George Allen and Unwin, Ltd, London. 1884.
- Chun W, Hancock RE. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2000 Sep 15; 60(1):25-32.
- Kalchayanand N, Dunne P, Sikes A, Ray B. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. *Int J Food Microbiology.* 2004. 91(1): 91-98
- Van-Kooij JA, Boer E. A survey of the microbiological quality of commercial tofu in the Netherlands. *Int. J. of Food Microb.* 1985; 2 (6):349-354.
- Champagne CP, Aurouze B, Goulet G. Inhibition of Undesirable Gas Production in Tofu (Abstract). *J. of Food Sci.* 1991; 56 (6):1600-1603.
- Ashenafi M. Microbiological evaluation of tofu and tempeh during processing and storage. *J. Plants Foods for Human Nutrition.* 1994; 45 (2):183-189.

18. Matsuzawa K., Yamanaka S, Yamashita H, Yamaguchi T, Ueda O, Terashita T. Isolation and identification of a microorganism from juten-tofu with yellow spots (*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*). Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 1988; 45(1):66-68.
19. No HK, Park NY, Lee SH, Hwang JH, Meyers SP. Antibacterial activities of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weight on spoilage bacteria isolated from tofu. J. of Food Sci. 2002; 67 (4):1511-1514.
20. Bauer R., Chikindas, M.L., Dicks, L.M.T. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. Int. J. of Food Microb. 2005; 101: 17– 27.
21. Biswas S R., Ray P, Johnson MC, Ray B. Influence of growth condition on the production of bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl Environ Microbiol. 1991; 57:1265-1267.
22. Osmanagaoglu O, Beyatli Y, Ufuk GNDZ. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from vacuum-packed sausages. Turk. J. of Biol 2001; 25:133-143.
23. Yang R., Johnson MC, Ray B. Novel method to extract large amount of bacteriocin from lactic acid bacteria. Appl Environ. Microb. 1992; 58:3355-3359.
24. Gonzales CF, Kunka BS. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl Environ Microbiol. 1987; 53:2534-2538.
25. Marwati T, Richana N, Harmayani E, Rahayu ES. Produksi dan Purifikasi Pediosin PaF-11 dari *Pediococcus acidilactici* F-11. J Pascapanen. 2012; 9(1): 11-17.
26. Marwati T, Richana N, Harmayani E, Rahayu ES. Karakterisasi gen penyandi pediosin PaF-11 pada *Pediococcus acidilactici* F-11. J. Berita Biologi. 2010. Volume 11(2):Proof.
27. Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. Microb. Cell Fact. 2009 8:3doi:10.1186/1475-2859-8-3.
28. Motlagh A, Bukhtiyarova M, Ray B. Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. Lett. Appl. Microbiol. 1994; 18:305-312.