

TEKNIK PRODUKSI DAN PURIFIKASI PEDIOSIN PaF-11 DARI *Pediococcus acidilactici* F-11

Tri Marwati¹, Nur Richana¹, Eni Harmayani² dan Endang S. Rahayu²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor
Jl. Tentara Pelajar 12 A Bogor

²Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Jl. Flora 1 Bulaksumur Yogyakarta
Email address:watipasca@yahoo.com

Pediosin PaF-11 dari *Pediococcus acidilactici* F-11 berpotensi sebagai pengawet pangan karena kemampuannya dalam mengendalikan pertumbuhan bakteri pembusuk pangan. Efektivitas purifikasi diperlukan dalam aplikasi pediosin PaF-11 pada industri pangan. Untuk itu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas pediosin PaF-11 selama proses inkubasi sel *P. acidilactici* F-11 dan meningkatkan efektivitas purifikasi pediosin PaF-11. Perlakuan yang dicobakan pada proses purifikasi yaitu adsorpsi dan desorpsi pada pH yang bervariasi dan penambahan biomassa sel mati dari *P. acidilactici* F-11 pada konsentrasi yang bervariasi selama proses adsorpsi. Aktivitas antibakteri pediosin PaF-11 diuji dengan metode difusi agar menggunakan bakteri indikator *Lactobacillus pentosus* LB42. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pediosin PaF-11 yang diproduksi dengan menggunakan kultur awal *P. acidilactici* F-11 sebanyak 10% dengan lama inkubasi 16 jam mempunyai aktivitas 2000 AU/ml. Pediosin PaF-11 yang dihasilkan *P. acidilactici* F-11 dengan kultur awal 1% dan purifikasi pada pH adsorpsi pH 6,5 dan pH desorpsi 2,0 memiliki aktivitas tertinggi yaitu 1500AU/ml, dibandingkan perlakuan pH yang lain. Aktivitas pediosin PaF-11 yang dihasilkan dari proses purifikasi tanpa penambahan biomassa sel mati yaitu 1500AU/ml, sedangkan dengan penambahan biomassa sel mati 3, 6 dan 11 kali dari konsentrasi awal menjadi 3000AU/ml. Hal ini berarti bahwa dengan penambahan biomassa sel mati *P. acidilactici* F-11 dengan 3 kali konsentrasi awal mampu meningkatkan pediosin PaF-11 yang diperoleh.

Kata kunci : *Pediococcus acidilactici* F-11, pediosin PaF-11, produksi, purifikasi.

ABSTRACT. Tri Marwati, Nur Richana, Eni Harmayani and Endang S. Rahayu. 2012. **Technique in Production and Purification of Pediocin PaF-11 from *Pediococcus acidilactici* F-11.** Pediocin PaF-11 produced by *Pediococcus acidilactici* F-11 has potential as biopreservative due to their capability to control spoilage food born bacteria. The effectiveness purification required to support pediocin PaF-11 application in the food industry. Therefore the objectives of this research were (1) to find out the activity of pediocin PaF-11 during incubation time of *P. acidilactici* F-11 and (2) to increase the effectiveness of pediocin purification by treatment in various pH adsorption desorption and addition of heat killed biomass of *P. acidilactici* F-11 in various concentration during adsorption. Pediocin PaF-11 assayed by well diffusion assay using *P. Lactobacillus pentosus* LB42 as indicator cell. Result showed that pediocin PaF-11 produced by *P. acidilactici* F-11 using 10% culture starter and incubated for 16 hours has activity 2000 AU/ml. Pediocin PaF-11 produced by *P. acidilactici* F-11 using 1% culture starter and purified at pH adsorption 6,5 and desorption 2,0 has highest activity (1500 AU/ml) compared with other pH treatments. Pediocin PaF-11 activity obtained from purification with no addition of heat killed biomass was 1500 AU/ml, while by addition with of heat killed biomass 3, 6, and 11 times of original concentration were 3000 AU/ml. Therefore it was suggested that addition of heat killed biomass of *P. acidilactici* F-11 during adsorption with 3 times of original concentration was able to increase the pediocin PaF-11 obtained.

Keywords: *Pediococcus acidilactici* F-11, pediocin PaF-11, production, purification

PENDAHULUAN

Pediosin yang dihasilkan oleh *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. parvulus* dan *P. pentosaceus* potensial digunakan sebagai pengawet pangan karena kemampuannya dalam mengontrol pertumbuhan bakteri pembusuk. Aplikasi bakteri sebagai pengawet pangan dapat dilakukan dengan menggunakan kultur penghasil bakteriosin atau dengan ekstrak substansi antibakteri yaitu bakteriosin^{1,2}. Pediosin PaF-11 merupakan bakteriosin yang dihasilkan dari *P. acidilactici* F-11. Kultur *P. acidilactici* F-11 pada pembuatan ikan sua gurame dapat menekan pertumbuhan bakteri koliform³. Biomassa *P. acidilactici* F-11 yang disemprotkan pada paprika dan wortel yang disimpan dingin dapat menekan pertumbuhan *S. aureus*⁴. Aplikasi supernatan *P. acidilactici* F-11 untuk penyimpanan

tahu pada suhu dingin dengan kombinasi pasteurisasi 5 menit pada suhu 95°C dapat menekan bakteri tahu sebesar 2 log cycle, sedangkan aplikasi kombinasinya dengan perendaman semalam pada suhu 4°C dapat menekan bakteri sekitar 2 log cycle. Aplikasi supernatan *P. acidilactici* F-11 dengan kedua cara di atas dapat memperpanjang masa simpan tahu sampai 7 hari⁵.

Pediosin dapat diproduksi dengan menumbuhkan bakteri penghasil menggunakan media MRS broth dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 16-18 jam^{6,7,8} atau 37°C selama 18 jam^{9,10,11}, media CGB (*Casein Glucose Broth*) pada suhu 37°C¹² dan media TGE (*Tryptone Glucose Yeast extract*) cair pada suhu 35°C¹³ atau 37°C selama 16-18 jam¹⁴. Pada produksi pediosin AcH dari *P. acidilactici* H, dengan suplementasi media TGE dengan tween 80, Mn²⁺ dan Mg²⁺ dapat meningkatkan produksi pediosin

AcH. Pada pH media awal 6,5 dan akhir 4,0 memberikan aktivitas pediosin tertinggi, sedangkan suhu terbaik adalah 37°C¹⁴. Beberapa peneliti melaporkan keunggulan media TGE dari pada MRS. Media TGE dengan pH awal 6,5 menghasilkan pediosin dari *P. acidilactici* yang lebih tinggi dari pada media MRS. Peningkatan tripsin, glukosa dan yeast ekstrak sampai 2 % dapat meningkatkan hasil hingga 10 %. Hasil tertinggi diperoleh dengan glukosa, diikuti sukrosa, xilosa dan galaktosa. Demikian pula untuk produksi pediosin dari *P. acidilactici* NRRL B5627, glukosa merupakan sumber karbon yang paling optimal¹⁵.

Salah satu metode purifikasi pediosin adalah desorpsi adsorpsi¹⁶. Prinsip kerja metode adsorpsi-desorpsi adalah pada pH sekitar netral bakteriosin akan menempel pada permukaan sel bakteri produser, sedangkan pada pH rendah akan terjadi pelepasan bakteriosin ke lingkungannya. Dilaporkan bahwa adsorpsi pediosin pada permukaan sel bakteri gram positif termasuk sel bakteri penghasil, tergantung pada pH, dengan maksimum adsorpsi pada pH di atas 6,0 dan adsorpsi sangat kecil pada sekitar pH 2,0. Metode adsorpsi desorpsi merupakan prosedur yang praktis untuk produksi bakteriosin dalam jumlah besar untuk digunakan sebagai biopreservatif. Total kehilangan bakteriosin pada supernatan maupun hilang bersama sel setelah ekstraksi cukup rendah^{16,17}. Kehandalan metode adsorpsi desorpsi ini ditunjukkan pada beberapa hasil penelitian berikutnya. Dengan teknik adsorpsi desorpsi aktivitas spesifik bakteriosin yang dihasilkan lebih rendah dibanding teknik kromatografi, tetapi aktivitas totalnya lebih tinggi^{18,19}. Ditegaskan bahwa metode adsorpsi desorpsi bakteriosin mudah dilaksanakan dan lebih murah dan sel dapat digunakan untuk beberapa kali ekstraksi bakteriosin¹⁸.

Pediosin dapat teradsorpsi secara efisien pada sel yang dimatikan dengan pemanasan¹⁶. Adsorpsi awal terjadi karena interaksi ionik antara molekul pediosin dan permukaan sel. Komponen molekul pada permukaan bakteri gram positif dimana molekul pediosin diadsorpsi (reseptor) adalah asam teikoat dan asam lipoteikoat^{17,20}. Penambahan massa sel mati dari bakteri penghasil *L. mesenteroides* SM22 pada proses adsorpsi meningkatkan ekstraksi bakteriosin. Semakin banyak massa sel yang ditambahkan pada kultur maka sisi yang dapat menyerap bakteriosin semakin banyak sehingga lebih efektif untuk adsorpsi bakteriosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanpa penambahan massa sel, bakteriosin dari *Leuconostoc* SM 22 memiliki aktivitas 1000 AU/ml, setelah ditambah massa sel sebanyak 6 kali dan 11 kali massa sel mula-mula, maka aktivitasnya meningkat menjadi 2000 AU/ml²¹. Data tersebut menunjukkan bahwa dengan penambahan massa sel mati dengan

konsentrasi tertentu akan meningkatkan efektivitas ekstraksi.

Berdasar hasil penelitian sebelumnya telah diketahui pada pH mendekati netral, terjadi adsorpsi bakteriosin pada sel bakteri produser, sedangkan pada pH rendah terjadi desorpsi ke lingkungannya, sehingga pemilihan pH untuk adsorpsi dan desorpsi merupakan faktor yang penting untuk mendapatkan pediosin PaF-11 secara maksimal dengan kemurnian yang tinggi. Selain itu, telah diketahui bahwa apabila massa sel semakin banyak, maka permukaan yang memungkinkan terjadinya pengikatan bakteriosin juga semakin banyak sehingga diharapkan bakteriosin yang terikat pada tahap adsorpsi akan lebih banyak, dan bakteriosin yang dilepaskan pada tahap desorpsi juga lebih banyak dibandingkan tanpa penambahan massa sel. Dengan demikian maka perlu diketahui sejauh mana penambahan massa sel mati dapat meningkatkan efektivitas purifikasi pediosin PaF-11. Untuk itu maka dilakukan penelitian yang bertujuan (1) mengetahui aktivitas pediosin PaF-11 selama proses inkubasi sel *P. acidilactici* F-11 (2) meningkatkan efektivitas purifikasi pediosin PaF-11 dengan perlakuan adsorpsi dan desorpsi pada pH yang bervariasi dan penambahan biomassa sel mati dari *P. acidilactici* F-11 pada konsentrasi yang bervariasi selama proses adsorpsi.

BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Kultur *P. acidilactici* F-11 dan *L. pentosus* LB42 masing masing sebagai bakteri penghasil dan indikator uji aktivitas pediosin PaF-11. Kedua kultur tersebut diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC), Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Untuk pemeliharaan kultur dan produksi pediosin PaF-11 digunakan media TGE (Trypton, Glukose, Ekstrak yeast) cair sedangkan untuk pengujian aktivitas digunakan media TGE agar lunak dan keras. Komposisi media TGE cair adalah : 1% tripton, 1% glukosa, 1% ekstrak yeast, 0,2% tween, 0,005% MnSO₄·H₂O, 0,0056% MgSO₄·7H₂O dengan pengaturan pH 6,5. Komposisi media TGE agar lunak dan keras sama dengan media TGE cair dengan penambahan agar 0,75% dan 1,5%.

B. Metode

Experimen 1. Produksi Pediosin PaF-11

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 pada biomassa sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi kultur pada kecepatan 3500 rpm selama 15

menit. Campuran tersebut divortex 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 pada suhu 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.

Proses Produksi Pediosin PaF-11

Pada percobaan ini, produksi pediosin PaF-11 dilakukan dengan menumbuhkan 10 % inokulum *P. acidilactici* F-11 dalam media TGE cair (500 ml) pH 6,5^{13,14} dan diinkubasi pada suhu 37°C . Inkubasi dilakukan selama 24 jam, dengan pengukuran optical density dan pH kultur serta pengujian aktivitas antibakteri pediosin PaF-11 pada jam ke 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 dan 24. Pediosin PaF-11 untuk uji aktivitas, diperoleh secara purifikasi dengan metode adsorpsi desorpsi Yang *et al.*¹⁶ yang telah diadopsi oleh beberapa peneliti berikutnya^{18,19,22}. Kultur *P. acidilactici* F-11 yang telah diinkubasi tersebut 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 menit 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.

Experimen 2. Purifikasi Pediosin PaF-11 dengan Variasi pH Adsorpsi dan Desorpsi

Satu persen inokulum *P. acidilactici* F-11 ditumbuhkan dalam media TGE cair pH 6,5 dengan volume 500 ml^{14,13} dan diinkubasi pada suhu 37°C . Kultur *P. acidilactici* F-11 yang telah diinkubasi selama 16-18 jam dipanaskan selama 15 menit untuk mematikan sel dan merusak aktivitas enzim proteolitik. Selanjutnya dilakukan adsorpsi pada pH 6,0; 6,5 dan 7,0 yang diatur menggunakan 10 mM NaOH. Kemudian dilakukan stiring pada 4°C selama 24 jam kemudian sentrifugasi 15.000 x g selama 15 menit untuk mendapatkan endapan

(mengandung sel dan pediosin). Endapan selanjutnya dicuci dengan 2 mM Na_2HPO_4 dan resuspensi dalam 250 ml mM NaCl. Proses selanjutnya yaitu desorpsi pada pH 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; dan 4,0 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. Terhadap pediosin PaF-11 yang dihasilkan, dilakukan pengujian aktivitas dengan metode difusi agar. Eksperimen dilakukan dengan dua kali ulangan.

Experimen 3. Purifikasi Pediosin PaF-11 dengan Penambahan Biomassa Sel Mati pada Konsentrasi yang Bervariasi.

Percobaan purifikasi PaF-11 dengan penambahan biomassa sel mati mengacu pada metode Nugroho dan Rahayu²¹ dengan modifikasi. Dipersiapkan 4 tabung Erlenmeyer A,B, C dan D yang berisi media TGE cair masing masing dengan volume 50 ml dan 1 tabung Erlenmeyer dengan volume 850 ml, selanjutnya diinokulasi dengan *P. acidilactici* F-11 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Kultur hasil inkubasi A yaitu kultur yang hanya mengandung massa sel dari hasil diinokulasi dan disebut sebagai 1 kali konsentrasi massa sel awal. Kultur dari tabung Erlenmeyer tabung yang berisi media TGE 850 ml dibagi mejadi 3 tabung dengan volume masing masing 100, 250 dan 500 ml masing masing dipersiapkan untuk menghasilkan biomassa sel mati. Ketiga kultur tersebut dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, selanjutnya proses desorpsi pada pH 2 dengan stiring pada suhu 4°C selama 12 jam dan sentrifugasi 29.000 x g selama 30 menit hingga diperoleh massa sel mati bebas pediosin. Biomassa sel mati dari kultur 100 ml dimasukkan pada Erlenmeyer B dan disebut sebagai konsentrasi dengan 3 kali konsentrasi massa sel awal. Biomassa sel mati dari kultur 250 ml dimasukkan pada Erlenmeyer C dan disebut sebagai konsentrasi dengan 6 kali konsentrasi massa sel awal. Biomassa sel mati dari kultur 500 ml dimasukkan pada Erlenmeyer D dan disebut sebagai konsentrasi dengan 11 kali konsentrasi massa sel awal. Eksperimen dilakukan dengan dua kali ulangan.

Uji aktivitas pediosin PaF-11

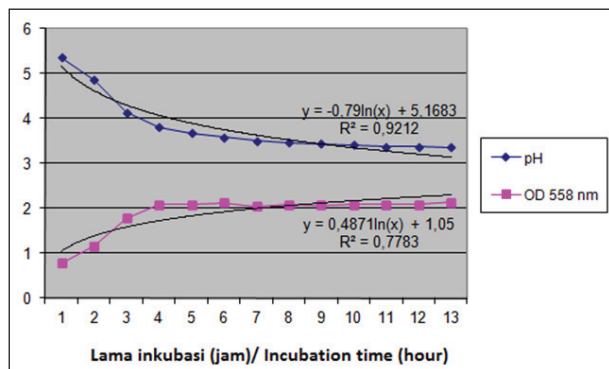
Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar yang dikembangkan Biswas *et al.*¹⁴ menggunakan sel indikator *L.pentosus* LB42. Dipersiapkan 5 ml media TGE agar keras (50°C) dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

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)²³. 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 20x maka besarnya aktivitas antibakteri adalah $1000/20 \mu\text{l} \times 20 = 1000\text{AU/ml}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Produksi Pediosin PaF-11

Hasil pengukuran densitas optik dan pH kultur *P. acidilactici* F-11 pada jam ke 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 dan 24 inkubasi terlihat pada Gambar 1. Dari Gambar tersebut terlihat bahwa terjadi peningkatan densitas optik dan penurunan pH selama waktu inkubasi. Peningkatan densitas optik menunjukkan adanya peningkatan populasi bakteri *P. acidilactici* F-1. Penurunan pH terjadi karena selama proses inkubasi berlangsung terjadi produksi metabolit primer berupa asam. Rendahnya pH lingkungan menyebabkan pediosin aktif yang dihasilkan *P. acidilactici* F-11 yang masih menempel pada dinding sel terlepas ke lingkungan.



Gambar 1. Densitas Optik dan pH kultur *P. acidilactici* F-11 selama inkubasi

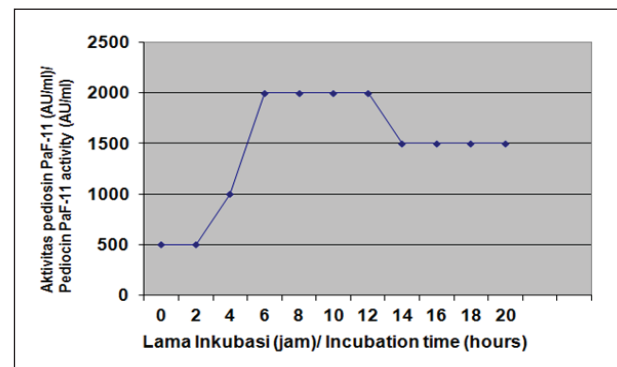
Figure 11. Optical density and pH of *P. acidilactici* F-11 culture during incubation

Aktivitas pediosin PaF-11 mulai meningkat setelah 8 jam inkubasi, dan stabil sampai 16 jam inkubasi (Gambar 2). Peningkatan aktivitas pediosin PaF-11 seiring dengan meningkatnya populasi bakteri (ditunjukkan oleh nilai OD pada Gambar 1). Terlihat bahwa sintesa pediosin PaF-11 terjadi pada awal fase eksponensial sampai fase stasioner. Hal ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya yang telah dilaporkan. Bakteriosin merupakan substansi antibakteri yang disintesis langsung di ribosom dan selama pertumbuhan bakteri asam laktat, produksi maksimum terjadi pada fase eksponensial sampai awal fase stasioner²⁴. Pada beberapa bakteri asam laktat sintesis bakteriosin oleh mikroba penghasil terjadi selama perjalanan fase eksponensial²⁵ yang biasanya mengikuti pola sintesis metabolit primer. Sistem produksi ini diatur oleh plasmid ekstrakromosom²⁶. Pada umumnya bakteriosin disintesis dalam bentuk lengkap secara langsung melalui jalur ribosom²⁷.

Sintesis bakteriosin oleh bakteri asam laktat tidak selalu hanya pada fase eksponensial yang berbarengan dengan sintesis metabolit primer, tetapi terdapat pula bakteri asam laktat yang mensintesis bakteriosin pada saat fase stasioner dimana pertumbuhan sel dan jumlah kematian memiliki angka yang sama dan persediaan nutrisi sudah mulai berkurang²⁸. Pediocin PD-1 disintesis selama fase eksponensial dan dicapai produksi maksimum pada fase stasioner sedangkan Plantaricin F, Pediocin N5p, Plantaricin diproduksi selama fase stasioner.

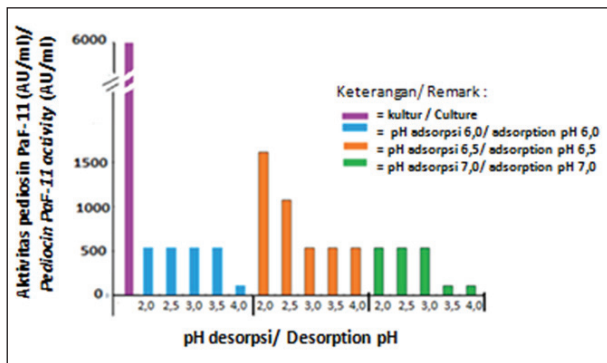
B. Efektivitas Purifikasi Pediosin pada Variasi pH Adsorpsi dan Desorpsi

Efektivitas purifikasi dinyatakan dengan banyaknya pediosin yang diperoleh pada proses purifikasi. Efektivitas purifikasi pediosin PaF-11 dipengaruhi oleh pH adsorpsi desorpsi seperti diperlihatkan pada Gambar



Gambar 2. Aktivitas Pediosin PaF-11 selama inkubasi

Figure 2. Pediocin PaF-11 activity during incubation



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri pediosin PaF-11 terhadap *L. pentosus* LB42
 Figure 3. Effect of pH on antimicrobial activity of pediocin PaF-11 against *L. pentosus* LB42

3. Dari Gambar tersebut terlihat bahwa pada pH adsorpsi 6,5 dan pH desorpsi 2,0 pediosin PaF-11 mempunyai aktivitas tertinggi, yang berarti bahwa pada kondisi tersebut terjadi proses adsorpsi desorpsi yang paling efektif. Akan tetapi apabila dilihat dari aktivitas pediosin yang sebenarnya ada di kultur yaitu 6000 AU/ml, maka purifikasi dengan kondisi tersebut masih kurang efektif.

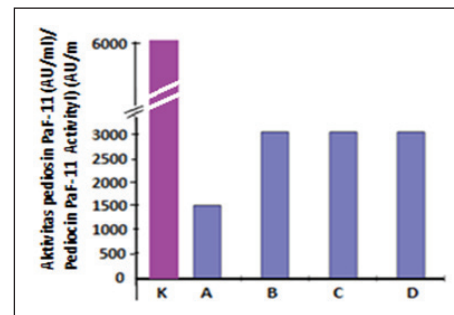
Pada proses adsorpsi dengan pH 6,5 maka muatan di sekitar media cenderung netral, sehingga pediosin yang bermuatan positif akan berikatan dengan asam teikoat dan asam lipoteikoat penyusun dinding sel yang bermuatan negatif^{17,20}. Pada proses desorpsi dengan pH 2,0 maka dalam larutan akan mengandung banyak ion positif dan menggantikan pediosin yang berikatan dengan dinding sel, sehingga pediosin dilepaskan ke media. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa purifikasi pediosin PaF-11 dengan metode adsorpsi desorpsi yang paling efektif yaitu pada pH adsorpsi 6,5 dan desorpsi 2,0. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan kondisi purifikasi pediosin ACH¹⁶, pediosin 05-10 dari *P. pentosaceus* 05-10²² dan pediosin P dari *P. pentosaceus* Pep1¹².

C. Efektivitas Purifikasi Pediosin pada Variasi konsentrasi penambahan massa sel mati

Zona hambat dan aktivitas pediosin PaF-11 hasil produksi pada berbagai penambahan massa sel mati terhadap *L. pentosus* LB42 terlihat pada Gambar 4. Konsentrasi penambahan biomassa sel mati berpengaruh terhadap efektivitas purifikasi, seperti ditunjukkan oleh aktivitas antibakteri pediosin PaF-11 pada Gambar 4. Pediosin PaF-11 tanpa penambahan biomassa sel, memiliki aktivitas 1500 AU/ml, tetapi dengan penambahan massa sel sebanyak 3, 6 dan 11 kali konsentrasi awal biomassa sel, maka aktivitasnya meningkat menjadi 3000 AU/ml. Hasil ini sesuai dengan bakteriosin yang dihasilkan oleh



(a)



(b)

Gambar 4. Pengaruh konsentrasi penambahan biomassa sel mati terhadap zona hambat (a) dan aktivitas antibakteri (b) pediosin PaF-11 yang dihasilkan oleh *P. acidilactici* F-11
 Figure 4. Effect of heat kill biomass on clear zone (a) and antimicrobial activity (b) of pediocin PaF-11 produced by *P. acidilactici* F-11

Dimana:/ Where:

K = Kultur *P. acidilactici* F-11/ *P. acidilactici* F-11 culture

A = konsentrasi awal biomassa sel mati / original concentration of heat kill biomass

B = Penambahan 3 kali konsentrasi awal biomassa sel mati / addition with 3 times of original concentration of heat kill biomass

C = Penambahan 6 kali konsentrasi awal biomassa sel mati / addition with 6 times of original concentration of heat kill biomass

D = Penambahan 11 kali konsentrasi awal biomassa sel mati / addition with 11 times of original concentration of heat kill biomass

L. mesenteroides SM22²¹. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan massa sel mati dengan konsentrasi tertentu akan meningkatkan efektivitas purifikasi. Akan tetapi apabila dilihat dari aktivitas pediosin yang sebenarnya ada di kultur yaitu 6000 AU/ml, maka purifikasi dengan kondisi tersebut cukup efektif.

Peningkatan aktivitas pediosin PaF-11 karena penambahan konsentrasi massa sel diduga karena dengan penambahan massa sel mati maka akan semakin banyak molekul asam teikoat dan asam lipoteikoat sehingga dapat mengikat lebih banyak molekul pediosin. Hal tersebut disebabkan karena adsorpsi pediosin tidak

dipengaruhi oleh pemanasan sel dan bahkan dengan menggunakan massa sel yang telah dimatikan maka menghindarkan hilangnya aktivitas pediosin karena aktivitas enzim proteolitik sel^{14,17}. Selain itu, pediosin dapat teradsorpsi secara efisien pada sel yang dimatikan dengan pemanasan¹⁶.

KESIMPULAN

Produksi pediosin PaF-11 dari *Pediococcus acidilactici* F-11 dapat dilakukan dengan media TGE dan inkubasi selama 16 jam pada suhu 37°C. Efektivitas purifikasi pediosin PaF-11 dipengaruhi oleh pH adsorpsi-desorpsi dan konsentrasi biomassa sel mati yang ditambahkan pada proses adsorpsi. Purifikasi pada pH adsorpsi 6,5 dan pH desorpsi 2,0 menghasilkan pediosin dengan nilai aktivitas 1500 AU/ml. Penambahan massa sel mati pada proses adsorpsi sebanyak 3 kali konsentrasi awal dapat meningkatkan efektivitas purifikasi, yaitu dengan nilai aktivitas 3000 AU/ml. Akan tetapi apabila dilihat dari aktivitas pediosin yang sebenarnya ada di kultur yaitu 6000 AU/ml, maka kedua cara purifikasi dengan kondisi tersebut masih belum efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Deegan LH., Cotter PD, Hill C Ross, P. Bacteriocin : Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy Journal* 2006. 16(9):1058-1071
- Gálvez. A., Abriouel, López RL, Gálvez NBO, Abriouel H, López RL, Omar NB. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation A Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 120:51–70.
- Nendissa JS, Rahayu ES. Pemanfaatan Kultur *Pediococcus acidilactici* F-11 Penghasil Bakteriosin untuk Memperbaiki Kualitas Ikan Sua Gurame (*Osporeus gourame lacepede*). Himpunan Makalah Seminar Nasional Teknologi Pangan. Prosiding Buku B: Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan. 2001. p: BO17-178. Semarang.
- Rahayu ES, Harmayani E, Utami T Handarini, K. “*Pediococcus acidilactici* F 11. Penghasil Bakteriosin sebagai Agensia Biokontrol E. Colli dan Staphilococcus aureus pada Sayuran Segar Simpan Dingin”. *J. Agritech.* 2004; 24 (3):113-124.
- Harmayani E, Rahayu ES, Djaafar T F, Wahyuningsih N. Marwati T. Pemanfaatan supernatan kultur *Pediococcus acidilactici* F-11 penghasil bakteriosin untuk memperpanjang masa simpan tahu. *J.Pascapanen.* 2009; 6(2): 85-93.
- Lozano J.C.N., Reguera-Useros, J.I., Pela’ ez-Marti’ nezb, M.C. Hardisson de la Torre, A. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. *Meat Sci.* 2002; 62: 237–243.
- Lozano J.C.N., Reguera-Useros, J.I., Pela’ ez-Marti’ nezb, M.C. Hardisson de la Torre, A. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat Sci.* 2006; 72 : 57–61.
- Bauer R., Chikindas ML, Dicks LMT. Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 101: 17– 27.
- 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
- Albano H., Todorov SD, van Reenen CA, Hogg T, Dicks LMT, Teixeira P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 116: 39–247.
- Halami PM, Ramesh A, Chandrashekar A. Megaplasmid encoding novel sugar utilizing phenotypes, pediocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* C20. *J. Food Microbiol.* 2000; 17: 475-83
- Schneider R., Fernández FJ, Aguilar MB, Guerrero-Legarreta I, Ipuche-Solis A, Ponce-Alquicira E. Partial characterization of a class IIa pediocin produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). *Food Control .* 2006; 17: 909–915.
- Osmanagaoglu O., Beyatli Y, Ufuk GNDZ. Isolation and Characterization of Pediocin Producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from Vacuum-Packed Sausages. *Turk J Biol.* 2001; 25:133-143.
- 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.
- 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.* 2008; 99:5384–5390.
- Yang R, Johnson MC, Ray B. Novel method to extract large amount of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. 58:3355-3359.
- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B., Kalchayanad N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J Appl Bacteriol.* 1991; 70:23-25.
- Atrih A., Rekhif N, Moir A.J.G., Lebrihi A., Lefebvre G. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 68: 93–104.

- 19 Wu CW, Yin LJ, Jiang ST. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J Agr Food Chem.* 2004; 52:1146-1151.
- 20 Jack RW, A. Carne, J. Metzger, S. Stefanovic', H.-G. Sahl, G. Jung, J. R. Tagg. Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthioninecontaining antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *Eur. J. Biochem.* 1994; 220:455-462.
21. Nugroho DA, Rahayu ES. Ekstraksi dan Karakterisasi Bakteriosin yang dihasilkan oleh *Leuconostoc mesenteroides* SM-22. *Jurn. Tek & Ind. Pangan.* 2003; XIV (3): 214-218.
22. Huang Y, Luo Y, Zhai Z, Zhang H., Yang Ch., Tian H, Zheng Li, Feng J, Liu H, Hao Y. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control* 2009; 20(11) : 1030-1035
23. Gonzales CF, Kunka BS. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53:2534-2538.
24. Jimenez Diaz, R. Plantaricin S and two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 Isolated From a Green Olive Fermentation. *Appl Environ Microbiol* . 1993. 59: 1416-1429
25. Samelis J, Roller S, Metaxopoulos J. Sakacin B, a Bacteriocin produce by *Lactobacillus sake* isolated from greek dry formaterd sausage. *J. Appl Bacteriol.* 1994. 76:475-486.
- 26, Ennahar S, Aoude-werner D, Sorokine D, Van Dorsselaer A, Bringel F, Hubert JC., Hesselmen C. Production of Pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92. *Appl. Environ Microbiol.* 1996. 62:4381-4387.
27. Engelkel G, Gutowski-Eckel Z, Kiesau P, Siegers K, ammelmannl, M., Entian KD. Biosynthesis of the Antibiotic Nisin, Genomic Organization and Membrane Localization of the Nis B Protein. *Appl Environ Microbiol* . 1992. 58: 3730-3734
- 28 Navaro L, Zaraxaga M, Saenz J, Ruiz-Larrea F, Torres C. Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated From Rioja Red Wines. *J. of Appl Microbiol.* 2000. 88:44-51.