

**Pengaruh Suhu, pH, Enzim dan Surfaktan terhadap Plantarisin F Rekombinan  
Enkapsulasi sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*  
(Temperature, pH, Enzyme and Surfactan Effect to Encapsulation of Plantaricin F  
Recombinant as Antibacterial of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*)**

**Apon Zaenal Mustopa<sup>1</sup>, Hasim<sup>2</sup> & Suci Amelia<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorium Rekayasa Genetika Terapan dan Desain Protein, Puslit Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

<sup>2</sup>Jurusan Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jl. Dramaga-Bogor 16680, Indonesia

Email : azmustopa@yahoo.com

**Memasukkan: Agustus 2017, Diterima Januari 2018**

**ABSTRACT**

*Staphylococcus aureus* causes diarrhea, which is one of the main cause of infant mortality, where as *Salmonella typhi* causes typhoid fever with the incidence rate of 180/100,000/year. Plantaricin F is an antimicrobial peptide that can inhibit the growth of *S. aureus* and *S. typhi*. The aim of this study is to determine the effect of temperature, pH, enzymes, and surfactants of encapsulated F recombinant plantaricin. Plantaricin F (1.61%) encapsulated with maltodextrin (5.36%) and skim milk (2.68%) using the spray dry with inlet temperature 150°C produced particles that are generally spherical with a rough texture, range in size, yield 25.03%, and had good antibacterial activity against *S. aureus* and *S. typhi*. The antibacterial activity plantaricin F encapsulated is not affected by the treatment temperature (40°C-100°C), pH (2-12), enzyme (proteinase-K, catalase, lysozyme, pepsin, trypsin), dan surfaktan (SDS, urea, triton X-100, PMSF, EDTA) treatment.

**Keywords:** Antibacterial, Encapsulation, Plantaricin F, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*

**ABSTRAK**

*Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan diare yang merupakan salah satu penyebab utama kematian balita dan *Salmonella typhi* adalah bakteri penyebab demam tifoid dengan angka kejadian 180/100.000/tahun. Plantarisin F merupakan peptida antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *S. typhi*. Penelitian ini bertujuan melakukan enkapsulasi dan mengetahui pengaruh suhu, pH, enzim, dan surfaktan yang sesuai dengan lingkungan pencernaan terhadap plantarisin F rekombinan enkapsulasi. Plantarisin F (1.61%) dienkapsulasi dengan maltodekstrin (5.36%) dan susu skim (2.68%) menggunakan metode *spray dry* dengan suhu *inlet* 150°C menghasilkan partikel yang secara umum berbentuk bola dengan tekstur yang kasar, berbagai ukuran, rendemen 25.03%, dan mempunyai aktivitas antibakteri yang baik terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*. Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tidak dipengaruhi oleh perlakuan suhu (40°C-100°C), pH (2-12), enzim (proteinase-K, katalase, lisozim, pepsin, tripsin), dan surfaktan (SDS, urea, triton-x 100, PMSF, EDTA).

**Kata Kunci:** Antibakteri, Enkapsulasi, Plantarisin F, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*

**PENDAHULUAN**

Penyakit infeksi disebabkan adanya invasi mikroorganisme patogen hidup seperti bakteri, diantaranya diare dan demam tifoid. Diare dapat disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang ditemukan secara alami pada kulit dan nasofaring tubuh manusia (Ryan & Ray 2004). *Staphylococcus aureus* memiliki beberapa toksin, diantaranya enterotoksin yang menyebabkan diare (Ryan & Ray 2004). Kejadian diare di

Indonesia dari tahun 2000 sampai dengan 2010 mengalami kenaikan (Kemenkes RI 2011). Kemampuan *S. aureus* menempel pada membran ekstraseluler dan protein plasma merupakan faktor penting dalam patogenesis yang menyebabkan infeksi (Harris *et al.* 2002). *Salmonella typhi* (*S. typhi*) merupakan patogen penyebab demam tifoid yang biasa ditemukan pada saluran pencernaan hewan dan manusia (Ryan & Ray 2004). Menurut Bhan *et al.* (2005) demam tifoid adalah infeksi sistemik yang ditularkan melalui feses-oral, yaitu melalui air

dan makanan yang terkontaminasi. Angka kejadian penyakit ini di Indonesia cukup tinggi, yaitu 180/100.000/tahun pada anak usia 5-15 tahun (Ochiai *et al.* 2008).

Pengobatan demam tifoid dilakukan dengan pemberian antibiotika, istirahat, perawatan, dan asupan makanan bergizi, namun pemberian antibiotika yang tidak sesuai dapat menyebabkan berbagai efek samping. Peptida antimikroba yang dihasilkan bakteri (bakteriosin) merupakan salah satu alternatif pencegah infeksi dan diharapkan mampu menggantikan penggunaan antibiotika. Bakteriosin merupakan protein yang disintesis secara ribosomal, bersifat menghambat pertumbuhan, dan membunuh bakteri lain yang mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasilnya (Riley & Chavan 2007). Plantarisin F merupakan plantarisin yang diisolasi dari bakteri *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) S34 (Nurhaeni 2011). *Lactobacillus plantarum* S34 diisolasi dari bekasam (Mustopa *et al.* 2013), diproduksi dengan teknik DNA rekombinan pada *E. coli* (Mustopa *et al.* 2016), dan diproduksi pada sel inang *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) NZ3900 (Mustopa *et al.* 2016). Penggunaan *L. lactis* NZ3900 sebagai inang karena memiliki status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), mudah ditangani, dan mampu mensekresikan protein rekombinan pada media pertumbuhannya (Mierau *et al.* 2005).

Plantarisin F mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, dan *B. Cereus* dengan membentuk zona bening disekitar kertas cakram (paper disc) pada pengujian metode difusi agar (Arief *et al.* 2013). Mustopa *et al.* (2016) melaporkan bahwa aktivitas antibakteri plantarisin F terhadap *S. aureus* ATCC 6539 mengalami penurunan pada pH 2, pH 12, enzim katalase, lisozim, proteinase-K, dan pepsin. Bakteriosin dari *Lactobacillus paracasei* juga kehilangan aktivitas antibakteri setelah diinkubasi dengan enzim papain, pH 7 dan 9, proteinase-K, pepsin, tripsin, dan  $\alpha$ -chemotrypsin (Benjeddou *et al.* 2012). Untuk mempertahankan aktivitas antibakteri plantarisin F pada saluran pencernaan, maka diperlukan suatu teknologi yang mampu mengatasinya yaitu enkapsulasi.

Enkapsulasi merupakan salah satu teknik imobilisasi yang melindungi bahan aktif dalam sebuah matriks (Zuidam & Nevodic 2010).

Teknik enkapsulasi yang sering digunakan adalah *spray dry* (kering semprot), yang memiliki laju tinggi dan biaya operasional yang rendah. Maltodekstrin merupakan bahan yang digunakan untuk enkapsulasi karena merupakan polimer sakarida yang bergizi, tidak manis, mengandung unit *D-glukose* pada ikatan  $\alpha$ -1,4 dan memiliki nilai DE (*dextrose equivalence*) yang kurang dari 20. Nilai DE yang kecil membuat bahan ini mudah dikeringkan (Kenyon 2009). Penambahan susu krim sebagai bahan enkapsulan dapat melindungi dengan baik plantarisin, sehingga aktivitas hambat terhadap bakteri lebih optimum (Fu & Chen 2011).

Penyakit yang disebabkan infeksi bakteri seperti diare dan demam tifoid membutuhkan antibakteri yang berstatus aman dan dapat bertahan pada lingkungan yang ekstrim. Plantarisin F merupakan peptida yang sensitif terhadap pH, suhu, enzim, dan surfaktan. Berdasarkan pertimbangan tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan enkapsulasi dan menguji stabilitas plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan suhu, pH, enzim, dan surfaktan.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Isolat *L. lactis* rekombinan yang mengandung gen plantarisin F dan media M17 glukosa 200 mL disiapkan di dalam laminar. Antibiotika *cloramphenicol* sebanyak 10  $\mu$ g/mL dan isolat bakteri sebanyak 20 mL (10%) dimasukkan pada media. Bakteri diinkubasikan pada inkubator 30°C selama 2 jam dan ketika OD (*optical density*) sudah 0.5 maka induksi nisin 5 ng/mL dilakukan. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam (Mobitec 2012).

Hasil produksi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dikondisikan menjadi pH 6.5 dengan menggunakan 1 N NaOH agar asam organik yang dihasilkan tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri plantarisin. Selanjutnya plantarisin dimurnikan dengan amonium sulfat 80%. Amonium sulfat dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam larutan dan diaduk menggunakan *stirrer* pada suhu 4°C. Hasil endapan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 menit. Pelet hasil sentrifugasi diresuspensi dengan Tris HCl 10 mM pH 7.4 (Xie *et al.* 2011).

Aktivitas antibakteri pelet diuji dengan metode difusi agar terhadap patogen *S. aureus* dan *S. typhi*. Pemurnian dilanjutkan dengan kromatografi kolom filtrasi gel dengan *Sephadex G-50* yang telah dicuci dengan akuades steril dan diekuilibrasi dengan buffer Tris HCl 25 mM pH 7.4. Pelet dimasukkan ke dalam kolom sebanyak 2 mL, kemudian dilusi dengan buffer Tris HCl 25 mM pH 7.4 dengan kecepatan laju alir 1mL/45detik pada suhu 4°C. Hasil penampungan dihitung absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm dan dikelompokkan berdasarkan nilai absorbansi yang sama atau tidak berbeda jauh. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar pada patogen *S. aureus* dan *S. typhi*.

Uji aktivitas antibakteri terhadap patogen *S. aureus* dan *S. typhi* dilakukan dengan metode difusi agar (Arief *et al.* 2013). Patogen di kultur pada media *nutrient broth* (NB) dan dinkubasikan semalam pada suhu 37°C. Suspensi patogen di dilusi dengan NaCl 0.85% sebanyak 9 kali, kemudian 3 mL patogen hasil dilusi ditumbuhkan pada cawan petri dengan media *nutrient agar* (NA) sebanyak 17 mL. Sebanyak 20 µl plantarisin F diteteskan pada *papper disk* (kertas cakram) diameter 6 mm dan kemudian diletakkan pada media agar. Petri disimpan pada suhu 4°C selama 1 jam agar sampel plantarisin berdifusi ke agar dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Pengamatan aktivitas antibakteri dilakukan dengan menghitung diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram pada jam ke-2, 4, 6 dan semalam. Aktivitas antimikroba dinyatakan dalam *arbitrary unit* (AU) per mL, yaitu luas zona hambat tiap volume sampel (mm<sup>2</sup>/mL).

Fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi ditentukan bobot molekulnya dengan gel SDS-PAGE. Gel yang digunakan mengandung komponen 3.9% (v/v) *stacking gel* dan 16% (v/v) *separating gel* akrilamid. Sampel didenaturasi selama 10 menit pada suhu 100°C dengan *loading dye* 3x. Gel yang telah padat dipindahkan pada perangkat elektroforesis dan *buffer running* dimasukkan sampai gel terendam. Sampel sebanyak 20 uL dan *marker* sebanyak 0.4 uL dimasukkan ke sumur gel. Pewarnaan gel menggunakan *Silver Staining Kit*. Gel dicuci

dengan akuades steril selama 5 menit (2x), difiksasi dengan larutan *fixative* selama 15 menit (2x), disensitisasi dengan sensitizer selama 1 menit, dicuci dengan akuades steril selama 20 detik (2x), dan direndam dengan etanol 10%. Selanjutnya gel direndam dengan larutan *stain work* selama 30 menit untuk pewarnaan. Gel dicuci dengan akuades steril selama 20 detik (2kali) dan direndam dengan larutan *developer* selama 2-3 menit atau sampai pita muncul. Reaksi dihentikan dengan *stop solution* selama 10 menit. Pita-pita yang muncul menandakan protein yang terpisah dan gel dapat disimpan pada suhu 4°C agar gel tidak rusak (Laemmli 1970). Determinasi bobot molekul sampel dihitung dengan menggunakan persamaan  $y = (a \times \ln(X)) + b$  yang diperoleh dari grafik antar ordinat Log BM dan absis Rf. Perhitungan *retardation factor* (Rf) pada gel menggunakan rumus (Cavalli *et al.* 2006)

Konsentrasi protein diukur menggunakan BCA kit dan menggunakan BSA dengan konsentrasi 2000 µg/mL, 1500 µg/mL, 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 25 µg/mL sebagai standar. Sebanyak 10 µL sampel ditambahkan 200 µL *working reaction* yang merupakan campuran reagen A dan B dengan perbandingan 50:1 menggunakan *microplate 96 well*. *Microplate 96 well* ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm (Pierce Biotechnology 2013).

Bahan enkapsulasi yang digunakan pada penelitian ini adalah maltodekstrin 5.36% (11.67 gram), susu skim 2.68% (5.83 gram), dan air 90.34% (196.5 mL) dihomogenisasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit (Nasution 2009). Larutan didinginkan (4°C) selama 12-24 jam agar semua komponen bahan pengkapsul dapat terhidrasi sempurna dan mempermudah ekstrak plantarisin masuk ke dalam bahan penkapsul. Setelah proses pendinginan plantarisin F 1.61% (3.5 mL) ditambahkan dan larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Larutan kemudian dikeringkan dengan *spray dryer* dengan suhu outlet 75-80°C dengan laju alir *feed* 20 mL/menit dan suhu inlet 150°C (Kailasapathy 2002). Konsentrasi protein hasil enkapsulasi diukur dengan BCA kit dan aktivitas

antibakterinya diuji dengan metode difusi agar (0.45 gram/mL air destilasi steril).

Plantarisin F enkapsulasi dilarutkan dalam air destilasi dengan konsentrasi 0.45 mg/mL. Kestabilan aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi diuji dengan pemanasan pada suhu 40°C, 60°C, 80°C, dan 100°C dengan variasi waktu pemanasan 10, 30, dan 60 menit. Uji kestabilan pada perlakuan pH 2-12 (dengan interval 2 sunit pH) menggunakan NaOH 1N dan HCl 1N, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Setelah diinkubasi semua sampel dikembalikan lagi ke pH 6.5 (Zhu *et al.* 2014). Uji kestabilan pada perlakuan berbagai enzim menggunakan proteinase-K (1 mg enzim/mL), katalase (1 mg enzim/mL), lisozim (1 mg enzim/mL), pepsin (1 mg enzim/mL), dan tripsin (0.044 mg enzim/mL). Perlakuan enzim proteinase-K, katalase, lisozim, dan tripsin diinkubasi pada suhu 25°C selama 1 jam, sedangkan perlakuan enzim pepsin diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (Savadogo 2004). Aktivitas enzim dihentikan dengan cara, sampel diinkubasi pada suhu 100°C selama 5 menit (Zhu *et al.* 2004).

Uji kestabilan pada perlakuan berbagai surfaktan dilakukan dengan penambahan masing-masing (1% wt/v) SDS, urea, Triton X-100, EDTA, PMSF, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam (Yue *et al.* 2013). Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan suhu, pH, enzim, dan surfaktan diuji dengan metode difusi agar terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*.

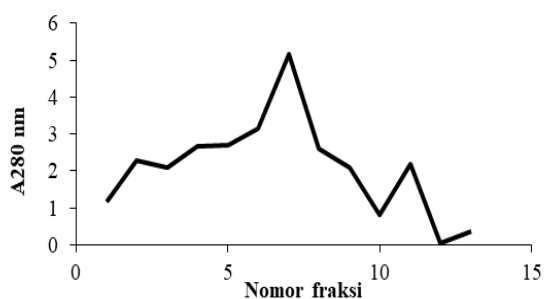
Analisis morfologi dilakukan untuk mengetahui bentuk plantarisin F setelah dienkapsulasi dengan maltodekstrin dan susu skim. Sampel bubuk diletakkan diatas karbon konduktor, diratakan, direkatkan dengan perekat ganda, dilapisi dengan emas dalam keadaan vakum karena sampel bukan merupakan bahan yang dapat memancarkan elektron, dan mesin SEM dioperasikan (Hyo *et al.* 2012). Pengamatan dilakukan menggunakan instrumen *scanning electron microscope* tipe JEOL seri JSM-5310 LV di Balai Pasca Panen Kementerian Pertanian, Cimanggu Bogor, Jawa Barat.

## HASIL

### Isolasi dan Purifikasi Plantarisin F

*Lactococcus lactis* F tumbuh dengan baik pada media M17 glukosa, yang dibuktikan dengan nilai OD sebesar 0.567 (*middle log*) selama dua jam inkubasi. Sentrifugasi menghasilkan cairan supernatan *L. lactis* F yang memiliki pH 4.5. Pemurnian supernatan yang mengandung plantarisin F dengan amonium sulfat 80% berupa pelet sebanyak 1.68 gram. Pelet dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom filtrasi gel *sephadex* G-50 dan dielusi menggunakan bufer Tris HCl 25 mM sehingga dihasilkan 13 fraksi sebanyak 2 mL masing-masing. Hasil pengukuran nilai OD fraksi dapat dilihat pada Gambar 1. Fraksi yang memiliki nilai OD yang berdekatan digabungkan dan diuji aktivitas antibakterinya. Terdapat empat fraksi hasil penggabungan dan fraksi ke-IV (8 dan 9) merupakan fraksi yang digabungkan karena memiliki nilai OD 2.61 dan 2.08 serta aktivitas hambatnya paling tinggi.

Pemurnian plantarisin F dilakukan sebanyak dua kali dan nilai aktivitas spesifik setiap tahap pemurnian terdapat pada Tabel 1. Aktivitas plantarisin didapatkan dengan menghitung selisih luas zona bening dengan luas *papper disk* dan dibagi dengan volume plantarisin yang dimasukkan. Aktivitas antibakteri paling tinggi terdapat pada tahapan pengendapan amonium sulfat yaitu 2318.20 mm<sup>2</sup>/mL. Total protein plantarisin setiap tahapan ditentukan dengan metode BCA. Total protein paling tinggi terdapat supernatan yaitu 1366.8 mg. Aktivitas spesifik merupakan aktivitas setiap 1 mg plantarisin F terhadap bakteri uji dan aktivitas *sephadex* G-50 memiliki aktivitas spesifik paling tinggi yaitu 502.28 AU/mg. Kemurnian tahapan pengendapan



**Gambar 1.** Profil fraksinasi pemurnian plantarisin F dengan *Sephadex* G-50. Menunjukkan fraksi yang digabungkan dan mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi.

amonium sulfat 116.65 kali dan *sephadex* G-50 627.85 kali dari supernatan.

**Aktivitas Antibakteri**

Supernatan memiliki daya aktivitas antibakteri yang lemah (8 mm), namun setelah dimurnikan dengan pengendapan amonium sulfat, pemisahan dengan kromatografi kolom filtrasi gel dan dienkapsulasi maka daya aktivitas antibakteri plantarisin F yang terbentuk meningkat (baik). Pada penelitian ini menggunakan kontrol positif 30 µg kloramfenicol. Diameter zona bening yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 2 dan gambar zona bening dapat dilihat pada Gambar 2. Pan *et al.* (2009) menyatakan bahwa terdapat tiga kategori aktivitas antibakteri, yaitu lemah dengan diameter zona bening 6-9 mm, baik dengan diameter zona bening 9-12 mm, dan kuat dengan diameter zona bening lebih dari 12 mm.

**Profil SDS PAGE dan Morfologi Plantarisin F Enkapsulasi**

Frakasi hasil pemurnian *sephadex* G-50 yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi ditentukan bobot molekulnya dengan elektroforesis SDS-PAGE (Gambar 3). Lajur 1 merupakan pita ptotein sampel dan lajur 2 merupakan *marker*. *Marker* digunakan sebagai penanda ukuran pita yang muncul. Ukuran pita ptotein

ditentukan dengan perhitungan *retardation factor* (RF) dan pita yang muncul berukuran 3.8 kDa.

**Plantarisin F Enkapsulasi**

Morfologi plantarisin F enkapsulasi secara umum berbentuk bola dengan tekstur yang kasar, membentuk lekukan, dan berbagai ukuran yaitu 3.686 µm, 7.390 µm, dan 27.58 µm pada perbesaran 1000X (Gambar 4). Plantarisin F enkapsulasi sebanyak 4.381 gram mempunyai struktur halus seperti bubuk tepung, seragam, dan berwarna putih. Nilai *arbitrary unit* protein hasil enkapsulasi yaitu 1766.25 AU, total protein sebanyak 5.26 mg, aktvitas spesifik 335.79 AU/mg, dan rendemenya sebesar 25.03%. Rendemen merupakan nilai perbandingan jumlah produk yang dihasilkan dengan jumlah bahan yang digunakan.

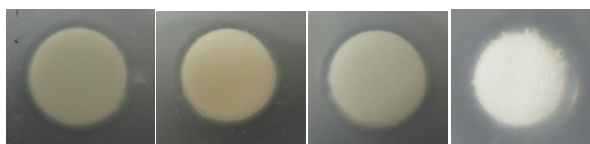
**Stabilitas Plantarisin F Enkapsulasi Setelah Perlakuan Suhu, pH, Enzim, dan Surfaktan**

Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tetap stabil setelah perlakuan suhu 40°C, 60°C, 80°C, dan 100°C, dengan waktu inkubasi masing-masing 15, 30, dan 60 menit. Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tidak berbeda jauh dengan kontrol (9 mm), baik pada *S. aureus* (Gambar 5) maupun pada *S. typhi* (Gambar 6). Kontrol merupakan plantarisin F

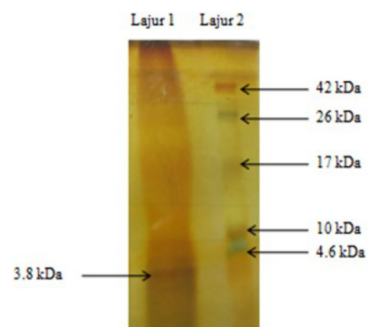
**Tabel 1.** Pemurnian plantarisin F

Tahapan	Volume (mL)	Aktivitas plantarisin (AU)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (AU/mg)	Hasil (%)	Kelipatan Kemurnian
Supernatan	200	1099	1366.8	0.80	100	1
Amonium sulfat	2	2318.20	24.84	93.32	210.93	116.65
<i>Sephadex</i> G-50	2	1945.33	3.85	502.28	177.01	627.85

**Keterangan:** aktivitas antibakteri plantarisin F terhadap *S. aureus*



**Gambar 2** Aktivitas antibakteri plantarisin F,(a) supernatan,(b) pelet amonium sulfat,(c) fraksi sephadex G-50, (d) enkapsulasi



**Gambar 3.** Profil SDS-PAGE plantarisin F menggunakan *Silverstaining kit*

**Tabel 2** Aktivitas antibakteri plantarisin F

Bakteri uji	Jenis Gram	Diameter zona bening (mm)				
		Supernatan	Pelet amonium sulfat	Sephadex G-50	Enkapsulasi	CMP
<i>S. aureus</i>	+	8	9.75	9.25	9	24.75
<i>S. typhi</i>	-	8	10	9	10	22

Keterangan : Diameter paper disk 6 mm; CMP: kloramfenicol

enkapsulasi yang telah dilarutkan dengan konsentrasi yang sama tetapi tidak dipanaskan (27°C). Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi mampu melindungi plantarisin F terhadap kenaikan suhu sampai 100°C.

Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tetap stabil setelah perlakuan pH 2-12, baik pada *S. aureus* maupun pada *S. typhi* jika dibandingkan dengan kontrol (Gambar 7). Kontrol merupakan plantarisin F enkapsulasi pH 6.5 yang mempunyai daya hambat bakteri sebesar 9 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 8.5 mm pada *S. typhi*. Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi mampu melindungi plantarisin F terhadap perubahan nilai pH.

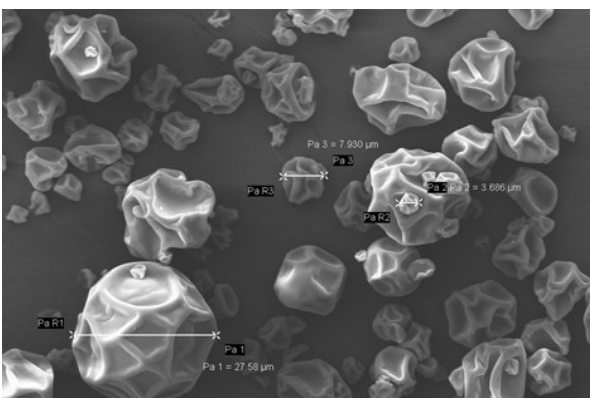
Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tetap stabil setelah perlakuan enzim proteolitik, katalase, dan lisozim, karena memiliki aktivitas hambat bakteri yang tidak jauh berbeda dengan kontrol, yaitu 9 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 9.25 mm pada *S. typhi* (Gambar 8). Enzim proteolitik yang digunakan yaitu proteinase-K, pepsin, dan tripsin. Kontrol merupakan plantarisin F enkapsulasi yang dilarutkan dengan konsentrasi yang sama tetapi tidak diinkubasi dengan

enzim. Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi mampu melindungi plantarisin F dari berbagai enzim.

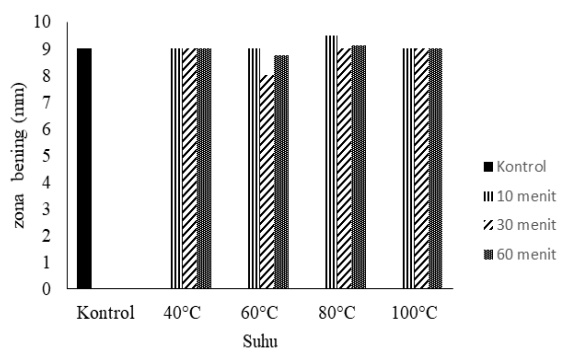
Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi tetap stabil setelah perlakuan SDS, triton-x 100, urea dan PMSF, baik terhadap *S. aureus* maupun *S. typhi*. Perlakuan dengan EDTA membuat aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi meningkat jika dibandingkan dengan kontrol (Gambar 9). Kontrol merupakan plantarisin F enkapsulasi yang dilarutkan dengan konsentrasi yang sama tetapi diberi perlakuan surfaktan. Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi mampu mempertahankan aktivitas plantarisin F dari berbagai surfaktan.

**PEMBAHASAN**

*Lactococcus lactis* merupakan salah satu inang yang sering digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan (Mierau et al. 2015). *Lactococcus lactis* memiliki kelebihan dibandingkan dengan *Escherichia coli*, yaitu mudah ditangani, dapat mensekresikan protein ke media pertumbuhannya sehingga tidak menghasilkan endotoksin, serta sifatnya telah banyak dikarakterisasi.



**Gambar 4** Morfologi plantarisin F enkapsulasi dengan *spray dry*



**Gambar 5.** Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan suhu terhadap *S. aureus*

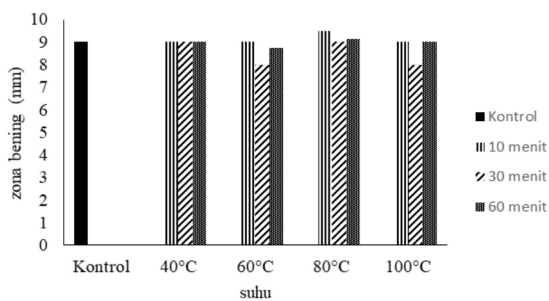


Bakteri Plantarisin F dienkapsulasi sebelum di uji aktivitas antibakterinya. Enkapsulasi merupakan teknologi pembungkusan bahan inti dalam kapsul berukuran mikro yang dapat melepaskan isinya dalam lingkungan tertentu (Mosilhey 2003). Proses enkapsulasi mempunyai berbagai keuntungan yaitu lebih tahan, stabil terhadap lingkungan eksternal, lebih awet, dan lebih ringan (Scannell *et al.* 2000). *Spray dry* merupakan metode enkapsulasi yang sering digunakan dalam industri pangan yang memiliki laju tinggi dan biaya operasional yang rendah (Rizqiati 2008). Kelebihan metode *spray dry* lainnya adalah mampu memproduksi kapsul dalam jumlah banyak dan jenis bahan pengkapsul yang cocok dengan metode ini layak dikonsumsi.

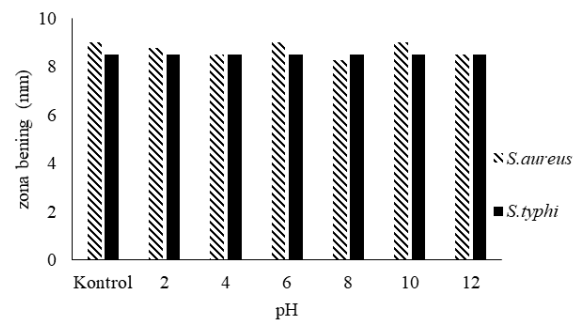
Enkapsulasi dengan komposisi plantarisin F 1.61%, maltodekstrin 5.36%, dan susu skim 2.68% merupakan enkapsulasi bakteriosin yang mempunyai aktivitas hambat tertinggi dibandingkan dengan komposisi lainnya, yaitu sebesar 945.32 AU/mL pada *E. coli* (Usmiati *et al.* 2009) dan sebesar 973.64 AU/mL pada *S. typhimurium* (Nasution 2009). Produk enkapsulasi yang ideal adalah berbentuk bubuk kering, mudah

disimpan, dan masa simpan atau stabilitasnya tinggi (Cook *et al.* 2012). Plantarisin F enkapsulasi tetap memiliki aktivitas antibakteri yang baik (Tabel 2), tetapi aktivitas spesifiknya mengalami sedikit penurunan jika dibandingkan dengan sebelum enkapsulasi. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya plantarisin yang rusak saat pengeringan dengan suhu 150°C. Enkapsulasi dikatakan berhasil jika bahan yang dienkapsulasi tetap memiliki sifat fisiologis yang sama atau tidak jauh berbeda (Yulinery *et al.* 2006) dan memiliki viabilitas yang relatif tinggi dengan sebelum dienkapsulasi (Triana 2006). Rendemen hasil enkapsulasi plantarisin F bernilai kecil (25.03%) dan jauh dari ideal (100%). Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor pada saat pengeringan, diantaranya kontinuitas yang terganggu dan proses homogenisasi yang tidak sempurna sehingga menyebabkan terjadinya penyumbatan celah *nozzle* (Nasution 2009). Faktor lain yang dapat menyebabkan kecilnya rendemen adalah kehilangan bobot produk pada *cyclone* pengering.

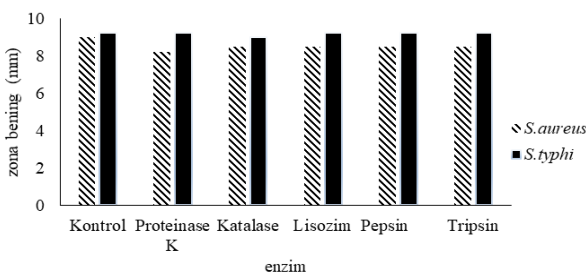
Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan suhu sampai 100°C, pH 2-12, inkubasi dengan enzim, dan surfaktan tidak mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan



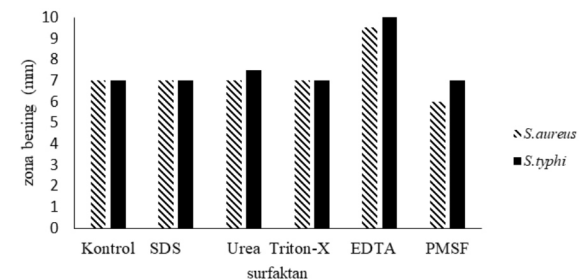
Gambar 6 Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan suhu terhadap *S. typhi*



Gambar 7. Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan pH terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*



Gambar 8. Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan enzim terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*



Gambar 9 Aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi setelah perlakuan surfaktan terhadap *S. aureus* dan *S. typhi*

bahwa enkapsulasi dapat melindungi plantarisin F terhadap lingkungan ekstrim. Mustopa *et al.* (2016), plantarisin F yang tidak dienkapsulasi mengalami penurunan aktivitas antibakteri setelah diinkubasi pada pH 2, pH 12, enzim katalase, lisozim, proteinase-K, dan pepsin. Kailasapathy (2002), enkapsulasi dapat memisahkan dan melindungi bakteriosin dengan lingkungan luarnya sampai dilepaskan, dengan cara meningkatkan stabilitas, daya simpan, dan pengontrolan keluarnya bakteriosin dari enkapsulan. Nasution (2009), perlakuan suhu tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas bakteriosin hasil enkapsulasi. Usmiati *et al.* (2009), hasil enkapsulasi *Lactobacillus sp.* tetap stabil pada penyimpanan pH 2-4. Proteinase-K merupakan enzim yang merusak ikatan peptida protein antara asam amino fenilalanin, triptopan, tirosin, dan alanin (Rawlings dan Salvesen 2013). Lisozim merupakan enzim glikosidase yang akan memutus ikatan  $\beta$ -(1, 4) antara NAM dan NAG sehingga akan merusak peptidoglikan dan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri (Murphy 2012). Katalase merupakan enzim yang mendegradasi hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, sehingga dapat mencegah oksidasi sel (Alfonso *et al.* 2009). Pepsin merupakan enzim yang mendegradasi protein dan pepsinogen merupakan perkursor pepsin dalam bentuk tidak aktif. Pepsin memutuskan ikatan residu asam amino aromatik dan leusin pada protein (Rawlings dan Salvesen 2013). Tripsin juga merupakan enzim yang dapat mendegradasi protein (Trowers dan Tischler 2014).

Surfaktan (*surface active agent*) merupakan substansi yang dapat menurunkan tegangan permukaan suatu larutan (Rosen dan Kunjappu 2012). (Chae *et al.* 2010), SDS dan triton-x 100 keduanya merupakan deterjen yang sifat ioniknya berbeda dan dapat merusak ikatan kovalen protein. EDTA merupakan substansi yang dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dengan membuat struktur membrannya rusak, sehingga membuat aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi lebih tinggi. PMSF merupakan inhibitor dari enzim serin protease (kimotripsin, tripsin, sistein), sehingga adanya enzim proteolitik tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri plantarisin F enkapsulasi terhadap patogen. Rossy (2008),

urea dapat mendenaturasi protein dengan merusak stabilitas pelipatan protein.

Morfologi plantarisin F enkapsulasi diamati dengan SEM. Bhandari *et al.* (2013), hasil enkapsulasi dengan metode *spray dry* mempunyai ukuran 3-100  $\mu$ m dan bentuknya seragam. Plantarisin F dapat dikatakan berada di dalam bulatan maltodekstrin dan susu skim, karena plantarisin yang tidak dienkapsulasi berbentuk batang seragam yang bebas (Smarda dan Benada 2005). Crittenden *et al.* (2006), *Bifidobacterium infantis* yang dienkapsulasi dengan *spray dry* berbentuk bulat yang mempunyai lekukan, menjadi tidak bebas, dan terperangkap dalam enkapsulan jika dilihat dengan TEM (*Transmission Electron Microscope*). Berdasarkan Gambar 4, tidak terlihat adanya retakan halus seperti yang dilaporkan Lian *et al.* (2001), yang dapat membantu keluarnya panas dari bakteriosin. Hal ini sesuai dengan Setyawati (2010), hasil enkapsulasi tidak memiliki retakan halus sehingga tidak terjadi aliran uap air.

## KESIMPULAN

Plantarisin F dapat dienkapsulasi dengan maltodekstrin dan susu skim menggunakan metode *spray dry* yang menghasilkan bubuk putih halus yang seragam. Plantarisin F enkapsulasi terbukti mempunyai aktivitas antibakteri yang stabil setelah perlakuan suhu (40°C-100°C), pH (2-12), enzim (proteinase-K, katalase, lisozim, pepsin, tripsin), dan surfaktan (SDS, urea, triton-x 100, PMSF, EDTA). Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar untuk pengujian secara *in vivo* untuk mengetahui efektifitas dari plantarisin tersebut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh program Insentif Riset Sistem Inovasi Nasional (INSINAS) dari Kementerian Riset Teknologi dan Perguruan Tinggi Tahun anggaran 2016-2017.

## DAFTAR PUSTAKA

Alfonso PM, X Biarnes, Vidossich P, Rovira C. 2009. The molecular mechanism of the



- catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*. 131(33): 11751-11761.
- Arief I, Jakaria, T. Suryati, Z. Wulandari, & E. Andreas. 2013. Isolation and characterization of plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* strains (IIA-1A5,IIA-1B1,IIA-2B2). *Media Peternakan*. 36(2):91-100.
- Bendjeddou K, M. Fons, P. Strocker, & D. Sadoun. 2012. Characterization and purification of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BMK 2005, and intestinal isolate active against multidrug-resistant pathogens. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 28:1543-1552.
- Bhan MK, R. Bahl & S. Bhatnagar. 2005. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*. 366 (9487): 749-62.
- Bhandari B, N. Bansal, M. Zhang, & P. Schuck. 2013. Handbook of Food Powder, Processes and Properties. New Delhi (IN): Woodhead Publishing.
- Cavalli SV, SV. Silva, C. Cimino, FX. Malcata, & N. Priolo. 2006. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from silybum marianum. *Plant Physiology*. 1-7.
- Chae P, S. Rasmussen, R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, & M. Goren. 2010. Maltoseopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization, and crystallization of membrane proteins. *Nature Methods*. 7:1003-8.
- Cook MT, G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, & VV. Khutoryanskiy. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. United Kingdom (UK): Department of FOOD and Nutritional Sciences, University of Reading.
- Crittenden R, R. Weerakkodoy, L. Sanguansri & M. Augustin. 2006. Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Applied Environment and Microbiology*. 72(3):2280.
- Fu, N. & XD. Chen. 2011. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International Journal*. 44:1127-1149.
- Harris, LG., SJ. Foster, & RG. Richards. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and technique for identifying and quantifying *S. aureus* adhesion in relation to adhesion to biomaterials: review. *Europe Cells and Materials*. 4:39-60.
- Hyo, Y., S. Yamada, M. Ishimatsu, K. Fukutsuji, & T. Harada. 2012. Antimicrobial effects of burow's solution on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Medical Molecular Morphology* 45:66-71.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 3: 39-48.
- KEMENKES (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia). 2011. *Buku Pedoman Pengendalian Penyakit Diare*. Jakarta (ID): Direktorat Jendral Pengendalian dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lian, W., H. Hsiao, & C. Chou. 2001. Survival of Bifidobacteria after spray drying. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 79-86.
- Mierau, I, K. Olieman, J. Mond & EJ. Smid. 2005. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microbial Cell Factories*. 4:16.
- Mobitec. 2012. *NICE: Expressions System for Lactococcus lactis*. Germany (DE): Mobitec GmbH.
- Mosilhey, SH. 2003. Influence of different capsule materials on the physiological properties of microencapsulated *lactobacillus acidophilus* [disertasi]. German (DE): Department of Food Technology, University of Bonn.
- Murphy, K. 2012. *Janeway's Immunobiology 8<sup>th</sup> Edition*. New York (US): Garland Science
- Mustopa, AZ. 2013. Isolation and characterization of *Lactobacillus plantarum* S34 from Indonesian traditional food. Korea Selatan

- (KR): Departemen of Bio-resources Science, the Graduate School, Dankook University.
- Mustopa AZ, Fatimah, Hasim. 2016. Karakterisasi Plantaricin Rekombinan Sebagai Biopreservatif Pangan. Prosiding Kongres Teknologi Nasional 2016 BPPT, Jakarta, 25-27 Juli 2016
- Mustopa AZ, Kusdianawati, Fatimah, RN. Umami, BR. Budiarto, & H. Danuri. 2016. Cloning and Expression of Plantaricin E and F Genes of *Lactobacillus Plantarum* S34 Isolated from Indonesia Traditional-Fermented Meat (*Bekasam*). *International Food Research Journal*. 20 (2) p 762-769; 2016
- Mustopa AZ, H. Murtyaningsih, Fatimah & Suharsono. 2016. Cloning and Heterologous Expression of Extracellular Plantaricin F Produced by *Lactobacillus plantarum* S34 Isolated from "Bekasam" in *Lactococcus lactis*. *Microbiology Indonesia* 10 (3): 95-106
- Nasution SR. 2009. Kajian aktivitas hambat pertumbuhan bakteri patogen oleh serbuk bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat galur SCG 1223 [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurhaeni R. 2011. Isolasi dan karakterisasi gen plantarisin EF dan JK dari *Lactobacillus plantarum* S34 [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ochiai RL, CJ. Acosta, MC. Danovaro, D. Baiqing, SK. Bhattacharya, MD. Agtini, ZA. Bhutta, DG. Canh, M. Ali, & S. Shin *et al.* 2008. A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implication for controls. *WHO*. 86:260-268.
- Pan XF, T. Chen, H. Wu, Tang, & Z. Zhou. 2009. The acid, bile tolerance, and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*. 20 : 598-602.
- Pierce Biotechnology. 2013. *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit*. Rockford [US]: Thermo Fisher Scientific.
- Rawlings N & Salvesen GS. 2013. *Proteolytic Enzymes Third Edition*. Waltham (US): Elsevier.
- Riley MA, & MA. Chavan 2007. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Berlin (DE): Springer Berlin Heidelberg.
- Rizqiaty H, BSL. Jenie, N. Nurhidayat & C. Nurwitri. 2008. Ketahanan dan viabilitas *Lactobacillus plantarum* yang dienkapsulasi dengan susu skim dan gum arab setelah pengeringan dan penyimpanan. *Animal Produc*. 10 (3).
- Rosen MJ, JT. Kunjappu. 2012. *Surfactants and Interfacial Phenomena Fourth Edition*. Canada (US): Wiley.
- Rosky PJ. 2008. Protein denaturation by urea: slash and bond. *PNAS*. 105(44): 16825-16826.
- Ryan KJ. & CG. Ray. 2004. *Sherris Medic Microbil*. New Yor (US): McGraw Hill.
- Savadogo A, A. Cheik, HN. Imael & SA. Traore. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strain isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal Nutrition*. 3(3):174-179.
- Scannel AGM, C. Hill, RP. Ross, S. Marx, W. Hartmeimer, & EK. Arendt. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin. *International Journal Food Microbiology*. 60: 241-249.
- Setyawati E. 2010. Karakteristik matrik mikrokapsul hasil campuran maltodekstrin dan sodium kaseinat dengan berbagai perbandingan melalui proses pengeringan semprot. Balai Besar Pelatihan Peternakan Jawa Timur, Malang.
- Smarda J & O. Benada. 2005. Phage tail-like (high molecular weight) bacteriocins of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* (*Enterobacteriaceae*). *Applied Enviroment and Microbiology*. 71(12):8970-8973.
- Triana, E, E. Yulianto, & N. Nurhidayat. 2006. Uji viabilitas *Lactobacillus* sp. Mar 8 terenkapsulasi. *Journal Biodiversitas*. 7 (2): 114-117.
- Trowers, E. & M. Tischler. 2014. *Gastrointestinal Physiology, Aclinical Approach*. Tucson (US): Springer.
- Usmiati S, S. Yuliani, & E. Noor. 2009. Aktivitas hambat bubuk ekstrak bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur CG 1223. *Jurnal*

- Teknologi Pertanian Indonesia*.21(2):102-112.
- Xie Y, H. An, Y. Hao, Q. Qin, Y. Huang, Y. Luo, & L. Zhang. 2011. Characterization of an *anti-Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. *Food Control* 22: 1027-1031.
- Yue T, PEIJ, & Y. Yuan. 2013. Purification and characterization of anti-bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protec.* 76 (9): 1575-1581.
- Yulinery T, E. Yulianto, & N. Nurhidayat. 2006. Uji fisiologis probiotik *Lactobacillus sp.* Mar 8 yang telah dienkapsulasi dengan menggunakan *spray dry* untuk menurunkan kolesterol. *Biodivertas.* 7(2): 118-122.
- Zhu X, Y. Zhao, Y. Sun, & Q. Gu. 2014. Purification and characteritaton of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus spp.* from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry.*165: 216-223.
- Zuidam NJ & V. Nevodic V. 2010. Encapsulation Technology for Active Food Ingredients and Food Processing. Serbia (EU): Springer.

