

Pengaruh Vitamin B Kompleks Pada Produksi Senyawa *Antimicrobial Peptides* dari *Pediococcus pentosaceus* Serta Uji Aktivitasnya Terhadap *Bacillus cereus* dan *Eschericia coli*

The Effect of Vitamin B Complex on the Production of Antimicrobial Peptides from *Pediococcus pentosaceus* and its Activity Test Against *Bacillus cereus* and *Eschericia coli*

Debby Ananda Febrianty, Wijanarka dan Isworo Rukmi

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jalan Prof. Soedarto, SH, Semarang, 50275

Corresponding Author ; debby.anandaf@gmail.com

Abstract

Both eukaryotic and prokaryotic organisms can produce antimicrobial peptides (AMPs) which function as a self-defense mechanism against other harmful organisms in the same ecological niche. *Pediococcus pentosaceus* is a species of Lactic Acid Bacteria (LAB) capable of producing AMPs in the form of bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances. The compounds it produces have received Generally Regarded as Safe status by the Food and Drug Association (FDA) and have potential as biological preservatives in the food sector. The production of these compounds can be influenced by environmental factors and growth medium of producing bacteria, so that optimization studies for the production of bacteriocin have been developed, in order to obtain optimal its activity. Vitamin B Complex is one of the growth factors needed by living things including bacteria to support their metabolism. This study aims to determine whether the addition of vitamin B complex affects the production and activity of AMPs from *P. pentosaceus*. Vitamin B Complex concentrations of 0 ppm, 0.1 ppm, 1 ppm and 10 ppm were added to the production medium of *P. pentosaceus*. Cell-free supernatants were harvested by centrifugation, then their activity was tested against *Bacillus cereus* and *Eschericia coli* using the Kirby Bauer method and analyzed using one way ANOVA parametric statistical test with a significance level of 0.05 and Duncan's post hoc test. The results showed that the addition of vitamin B complex was not significantly different to the activity of AMPs compounds, but in higher concentrations could reduce the activity of these compounds.

Keywords: Antimicrobial peptides, *Pediococcus pentosaceus*, Vitamin B Complex.

Abstrak

Organisme eukariotik maupun prokariotik dapat menghasilkan senyawa *Antimicrobial peptides* (AMPs) yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap organisme lain yang merugikan dalam relung ekologis yang sama. *Pediococcus pentosaceus* merupakan spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) yang mampu menghasilkan senyawa AMPs berupa bakteriosin maupun *bacteriocin-like inhibitory substances*. Senyawa yang dihasilkannya telah mendapat status *Generally Regarded as Safe* oleh *Food and Drug Association* (FDA) dan berpotensi sebagai pengawet biologis dalam bidang pangan. Produksi senyawa ini dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan medium pertumbuhan bakteri penghasil, sehingga studi optimasi produksi senyawa bakteriosin banyak dikembangkan, agar diperoleh aktivitas senyawa yang optimal. Vitamin B Kompleks merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang dibutuhkan makhluk hidup termasuk bakteri untuk mendukung metabolismenya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah penambahan vitamin B kompleks berpengaruh terhadap produksi dan aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus*. Vitamin B Kompleks konsentrasi 0 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm dan 10 ppm ditambahkan ke dalam medium produksi *P. pentosaceus*. Pemanenan supernatan bebas sel dilakukan dengan cara sentrifugasi, kemudian dilakukan uji aktivitasnya terhadap *Bacillus cereus* dan *Eschericia coli* menggunakan metode *Kirby Bauer* dan dianalisis menggunakan uji statistik parametrik *one way* ANOVA dengan taraf signifikansi 0,05 dan uji lanjut/*post hoc* Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan vitamin B kompleks tidak berbeda nyata terhadap aktivitas senyawa AMPs, akan tetapi pemberian dalam konsentrasi lebih tinggi dapat menurunkan aktivitas senyawa tersebut.

Kata Kunci: Antimicrobial peptides, *Pediococcus pentosaceus*, Vitamin B Kompleks

PENDAHULUAN

Antimicrobial Peptides (AMPs) disebut juga dengan *Host Defense Peptides* (HDPs), merupakan senyawa protein yang dihasilkan oleh hewan, tumbuhan, maupun bakteri, yang berguna untuk mekanisme pertahanan diri terhadap organisme lain yang merugikan pada relung ekologis yang sama (Yang *et al.*, 2014; Fuente-Núñez *et al.*, 2017). Bakteri Asam Laktat atau BAL merupakan salah satu kelompok bakteri yang mampu menghasilkan senyawa AMPs (Yang *et al.*, 2014). Senyawa AMPs yang dihasilkan oleh BAL memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam bidang pangan sebagai pengawet karena sifatnya yang mudah didegradasi oleh enzim pencernaan, sehingga tidak berdampak buruk terhadap mikrobiota pencernaan, serta telah dinyatakan sebagai senyawa dengan status *Generally Regarded as Safe* (GRAS) oleh FDA (*Food and Drug Association*) (Skariyachan & Govindarajan, 2019). Pengawetan pangan bertujuan untuk memperpanjang masa simpan suatu bahan pangan. Proses tersebut biasanya lebih banyak menggunakan bahan-bahan kimia sintetis dapat meningkatkan resiko kesehatan seperti kanker, alergi, kerusakan saraf, dan efek samping lainnya, apabila digunakan dalam jangka panjang (Anand & Sati, 2013). Hal tersebut menyebabkan permintaan proses pengawetan secara biologis semakin meningkat (Parada *et al.*, 2007). Proses pengawetan secara biologis melibatkan mikrobiota alami atau senyawa antimikroba yang dihasilkan. Senyawa AMPs yang dihasilkan oleh BAL disebut bakteriosin. (Skariyachan & Govindarajan, 2019)

Pediococcus pentosaceus adalah salah satu spesies BAL penghasil senyawa AMPs seperti bakteriosin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Anastasiadou *et al.*, 2008). Produksi senyawa bakteriosin dapat dipengaruhi oleh beragam faktor seperti suhu, pH, dan komponen nutrisi dalam medium. Produksi senyawa tersebut dilakukan pada medium *de Mann Rogosa and Sharpe* (MRS) *broth* yang menghasilkan pertumbuhan optimal bagi kelompok BAL dibanding media sintetik lainnya seperti *Luria Broth* (LB), *Nutrient Broth* (NB), dan *Trypticase Soy Broth* (TSB) (Chatterjee *et al.*, 2018). Oleh karena potensinya sebagai pengawet biologis, studi optimasi yang bertujuan untuk meningkatkan aktivitas senyawa tersebut telah

banyak dilakukan seperti pengaruh sumber karbon, pH, suhu dan waktu inkubasi (Mulyani *et al.*, 2009), serta suhu dan lama penyimpanan (Ladha & Jeevaratnam, 2020). Penelitian mengenai pengaruh suplementasi mikronutrien seperti vitamin dalam medium pertumbuhan bakteri belum banyak dilakukan. Vitamin merupakan senyawa organik yang berperan dalam metabolisme makhluk hidup termasuk bakteri. Menurut Anastasiadou *et al.* (2008), genus *Pediococcus* membutuhkan suplementasi mangan, asam amino dan vitamin B untuk pertumbuhannya. Vitamin B kompleks merupakan kelompok vitamin larut dalam air yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan dan berperan penting dalam metabolisme sebagai komponen koenzim.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh vitamin B kompleks terhadap aktivitas antimicrobial peptides dari *P. pentosaceus* terhadap *B. cereus* dan *E. coli*, dan mengetahui konsentrasi optimum vitamin B kompleks yang memberikan aktivitas antimicrobial peptides dari *P. pentosaceus* terbaik terhadap *B. cereus* dan *E. coli*. Manfaat dari penelitian ini adalah Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pengaruh vitamin B kompleks pada produksi dan aktivitas antimicrobial peptides yang dihasilkan oleh *P. pentosaceus*. Penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi dasar dalam studi optimasi lebih lanjut, untuk membuka peluang lebih besar bagi senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* untuk dimanfaatkan sebagai pengawet di masa depan.

BAHAN DAN METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus – Maret 2021, bertempat di Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang.

Pembuatan larutan stok vitamin B kompleks 100 ppm (modifikasi (Nasimuddin *et al.*, 2017))

Sebanyak 0,2 g tablet vitamin B Kompleks (mengandung 10 mg vitamin B kompleks) dihaluskan dan dilarutkan dalam 100 ml akuades sehingga diperoleh konsentrasi stok 100 ppm. Larutan vitamin disterilisasi dengan teknik filtrasi menggunakan *syringe* membran filter dengan diameter pori 0.22 µm. Larutan vitamin B kompleks 10 ppm, 1 ppm, dan 0,1 ppm dibuat dari larutan stok.

Peremajaan dan pemeliharaan isolat

Kultur *P. pentosaceus* yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Pangan UGM dipelihara dalam medium MRS Agar dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Hal yang sama dilakukan pada *E. coli* dan *B. cereus* dalam medium NA.

Konfirmasi isolat

Konfirmasi isolat meliputi Pewarnaan Gram, dan uji katalase.

Pembuatan kurva pertumbuhan *P. pentosaceus*

Kurva pertumbuhan dari *P. pentosaceus* dalam medium MRS Broth dilakukan secara turbidimetri dengan mengukur nilai *Optical Density* atau OD biakan setiap 2 jam sekali selama 48 jam, menggunakan spektrofotometer *visible light* pada panjang gelombang 570 nm.

Kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* dalam medium MRS Broth dengan penambahan vitamin B kompleks konsentrasi 0,1 ppm, 1 ppm, dan 10 ppm dilakukan dengan cara yang sama.

Produksi senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* (modifikasi Mulyani *et al.*, 2019)

Sebanyak 10% (v/v) inokulum *P. pentosaceus* (T20%) berumur 24 jam diinokulasikan secara aseptis ke dalam medium MRS broth dalam erlenmeyer yang mengandung vitamin B kompleks dengan konsentrasi 0 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, dan 10 ppm dengan pH awal 6,5. Seluruh perlakuan diinkubasi dalam suhu ruang menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Pengambilan supernatan bebas sel dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dari endapan selnya, kemudian difiltrasi menggunakan *syringe* membran filter dengan diameter pori 0,22µm.

Pembuatan suspensi bakteri uji

Biakan *B. cereus* diambil sebanyak 2-4 ose dari kultur murni, kemudian disuspensikan ke dalam NaCl 0,9% steril. Suspensi dibandingkan kekeruhannya secara visual dengan larutan standar McFarland 0,5 yang dibuat dengan cara mencampurkan 0,05 ml BaCl₂ 1% dan 9,95 ml H₂SO₄ 1%. Untuk memastikan keakuratan perbandingan, dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer *visible light* pada panjang gelombang 600 nm. Larutan standar McFarland 0,5 memiliki nilai absorbansi 0,08 –

0,1 yang setara dengan kepadatan sel 1,5 x 10⁸ CFU/ml.

Uji aktivitas antibakteri senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *B. cereus* dan *E. coli*

Uji aktivitas antibakteri senyawa AMPs dilakukan dengan metode *Kirby Bauer*. Sebanyak 20 ml medium MHA dituang ke dalam cawan petri secara aseptis dan dibiarkan memadat. Bakteri uji dengan kepadatan sel 1,5 x 10⁸ CFU/ml (standar McFarland 0,5) di-swab secara aseptis di atas permukaan agar dengan *cotton swab* steril. Kertas cakram diletakkan pada permukaan agar, kemudian diteteskan 20µl supernatan bebas sel secara aseptis. Larutan MRSB steril dengan pH 4,5 digunakan sebagai kontrol negatif dan larutan antibiotik Ampicilin 10 µg/ml sebagai kontrol positif diteteskan di atas kertas cakram sebanyak 20µl secara aseptis. Cawan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram. Diameter zona hambat tersebut diukur dengan jangka sorong.

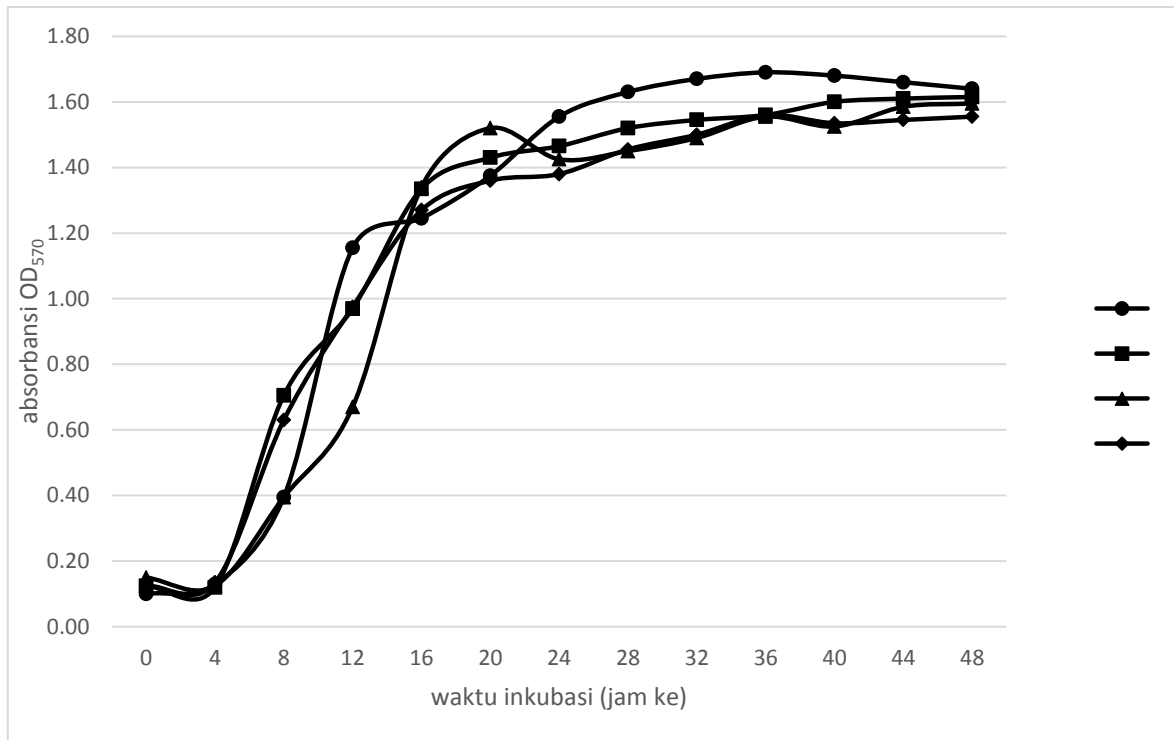
Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Variabel bebas penelitian ini adalah penambahan vitamin B kompleks dengan konsentrasi 0 ppm; 0,1 ppm; 1 ppm; dan 10 ppm dalam medium MRS broth, serta medium MRS tanpa inokulasi sebagai kontrol negatif dan Ampicilin 10µg/ml sebagai kontrol positif. Variabel terikat penelitian ini adalah aktivitas senyawa antimikroba terhadap *B. cereus* dan *E. coli*. Proses produksi dilakukan pada suhu ruang dengan pH awal yang sama yakni 6,5, serta pH akhir yang sama, 4,0. Pengujian senyawa antimikroba dilakukan dengan metode *Kirby Bauer*. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan *P. pentosaceus*

Kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* dibuat berdasarkan turbidimetri. Metode turbidimetri merupakan metode yang cepat dan efisien untuk menghitung kepadatan bakteri secara tidak langsung berdasarkan nilai *Optical Density* (OD) (Bakar *et al.*, 2015). Kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *P. pentosaceus* dalam medium MRS Broth(K0: Vitamin B Kompleks 0 ppm; K1: penambahan vitamin B kompleks 0,1 ppm; K2: penambahan vitamin B Kompleks 1 ppm; K3: penambahan vitamin B kompleks 10 ppm)

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 1., diketahui bahwa, pertumbuhan bakteri *P. pentosaceus* mengalami tiga fase pertumbuhan, yakni fase lag, fase logaritmik, dan fase stasioner. Fase lag dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-4 pada semua perlakuan. Fase lag merupakan fase bakteri beradaptasi pada lingkungan tumbuhnya. Setelah melewati fase lag, bakteri *P. pentosaceus* memasuki fase awal eksponensial mulai jam ke-6 untuk semua perlakuan dan memasuki fase akhir eksponensial rata-rata pada jam ke-24. Fase eksponensial ini lebih panjang dibanding penelitian Nghe & Nguyen, (2014), yang mana kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* pada fase eksponensial berlangsung sampai dengan jam ke-20 pada suhu 37°C. Hal ini mengindikasikan bahwa *P. pentosaceus* menunjukkan pertumbuhan yang baik walaupun berada di suhu ruang.

Fase eksponensial merupakan fase ketika bakteri aktif membelah dan memanfaatkan sumber daya yang ada dalam medium pertumbuhannya secara optimal (Hogg, 2013). Fase eksponensial pada penelitian ini ditandai dengan kenaikan nilai OD yang berlangsung sampai bakteri berada pada fase akhir eksponensial, yakni pada jam ke-24.

Perlakuan K0, K1, K2, dan K3 pada jam ke-24 berturut-turut telah mencapai absorbansi sebesar 1,56; 1,47; 1,42; dan 1,38. Berdasarkan nilai absorbansi kurva pertumbuhan dapat diketahui bahwa, perlakuan K0 (tanpa penambahan vitamin B kompleks) memiliki pertumbuhan yang paling tinggi dibanding perlakuan lainnya sehingga dapat diketahui bahwa penambahan vitamin pada konsentrasi K1, K2, dan K3 tidak membuat kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* secara keseluruhan menjadi lebih tinggi. Penambahan vitamin pada medium pertumbuhan *P. pentosaceus* mungkin dapat memengaruhi komponen medium MRS yang merupakan medium dasar bagi pertumbuhan BAL. Penelitian Anacarso *et al.* (2014) yang menambahkan beberapa kelompok vitamin B pada medium pertumbuhan *Lactococcus lactis*, menghasilkan aktivitas senyawa bakteriosin yang lebih rendah. Hal tersebut dapat disebabkan oleh perubahan dalam medium dasar akibat penambahan vitamin. Perubahan komposisi medium dasar (MRS) juga dapat memengaruhi pertumbuhan dan aktivitas senyawa yang dihasilkan oleh *P. pentosaceus* seperti pada penelitian Mulyani *et al.* (2019) yang mengganti

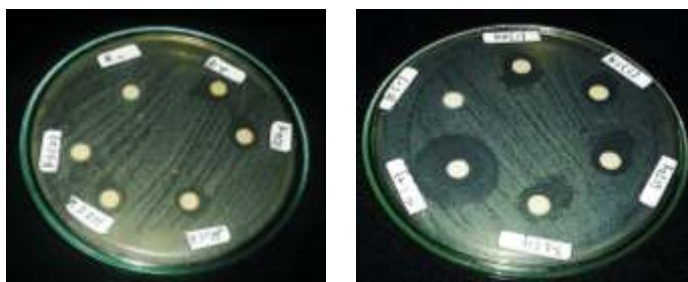
sumber karbon dari glukosa menjadi molase. Perubahan pada medium dasar tersebut menyebabkan turunnya aktivitas senyawa bakteriosin yang dihasilkan.

Pertumbuhan sel setelah jam ke-24 cenderung tetap untuk semua perlakuan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa, bakteri *P. pentosaceus* memasuki fase stasioner. Nutrien dalam medium yang dimetabolisme oleh bakteri untuk pertumbuhannya semakin lama semakin berkurang, sehingga pertumbuhan bakteri mulai stagnan dan memasuki fase stasioner.

Tujuan pembuatan kurva pertumbuhan *P. pentosaceus* adalah sebagai dasar menentukan waktu inkubasi untuk produksi senyawa AMPs dari bakteri *P. pentosaceus*. Berkaitan dengan produksi senyawa AMPs dari *P. pentosaceus*, Porto *et al.* (2017) menyatakan bahwa, senyawa AMPs dalam supernatan bebas sel dengan aktivitas yang maksimum dapat dipanen ketika sel telah memasuki fase awal stasioner. Berdasarkan pernyataan tersebut, maka waktu inkubasi yang sesuai untuk produksi senyawa AMPs adalah selama 24 jam. Penelitian Mulyani *et al.* (2019) tentang pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas anti-bakteri senyawa *pediocin* dari *P. pentosaceus* menunjukkan bahwa waktu inkubasi selama 24 jam menghasilkan aktivitas anti-bakteri terbesar dibanding ketika sel masih berada pada awal eksponensial dan akhir stasioner.

Aktivitas Senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *E. coli* dan *B. cereus*

Uji aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *E. coli* dan *B. cereus* dengan metode difusi Kirby-Bauer pada medium MHA dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Uji Aktivitas Senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap (a) *E. coli* dan (b) *B. cereus*

Gambar 2. menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat di sekitar kontrol negatif yang berarti bahwa, medium MRSB tanpa inokulasi yang telah disetarakan pH-nya dengan pH perlakuan, yakni 4,5 tidak memiliki aktivitas antibakteri. Oleh karena itu, zona hambat yang terbentuk ditiap

perlakuan berasal dari senyawa antimikroba yang ada dalam supernatan bebas sel. Merck (2019) menyatakan bahwa medium MRS merupakan medium dasar yang digunakan untuk isolasi, enumerasi, dan kultivasi BAL seperti *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, dan sebagainya.

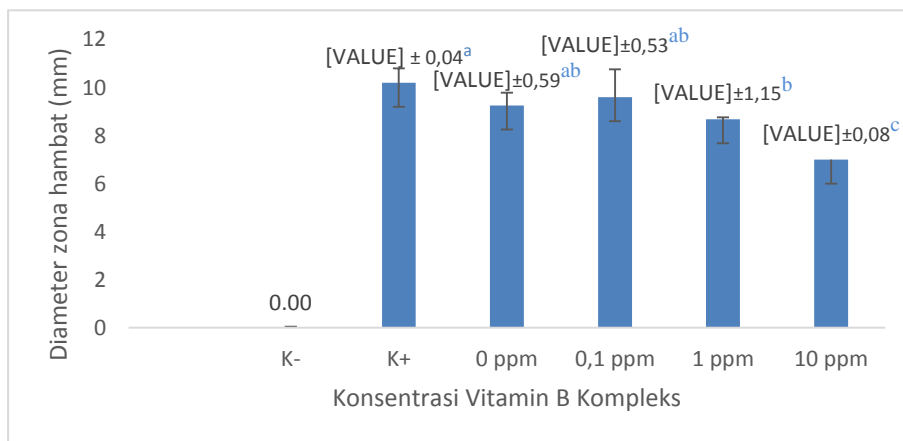
Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa AMPs terhadap *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2.a. Seluruh perlakuan yang diujikan memiliki aktivitas anti-bakteri terhadap *E. coli*, akan tetapi aktivitasnya lebih rendah dibanding kontrol positif. Diameter zona hambat yang terbentuk pada kontrol positif antibiotik Ampicilin adalah sebesar 10,25 mm. Ampicilin merupakan antibiotik kategori β -lactam yang bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri target. Sumampouw (2018), Ampicilin merupakan antibiotik β -lactam yang memiliki aktivitas luas (*broad spectrum*) terhadap Gram negatif maupun Gram positif. Cara kerja Ampicilin adalah dengan menghambat sintesis dinding sel sehingga, dinding sel menjadi lemah dan menyebabkan sel target menjadi lisis.

Berdasarkan data yang dapat diamati pada Gambar 3.a, seluruh perlakuan memiliki aktivitas terhadap *E. coli* ditandai dengan zona hambat yang terbentuk, namun aktivitasnya lebih rendah dibanding kontrol positif antibiotik Ampicilin. Aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* secara statistik memiliki nilai signifikansi 0,02 ($<0,05$), yang berarti aktivitas senyawa tersebut berbeda nyata.

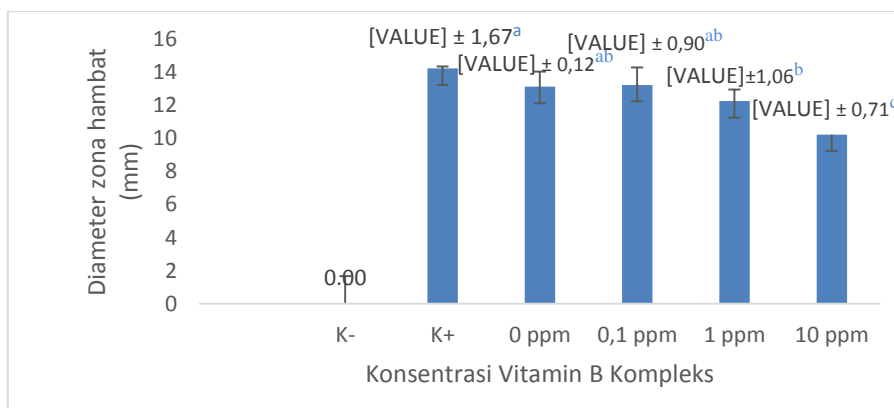
Zona hambat terbesar ada pada perlakuan K1 yakni sebesar 9,60 mm, namun secara statistik tidak berbeda nyata dengan zona hambat pada perlakuan K0 dan K2, sementara zona hambat terkecil pada K3 memiliki perbedaan nyata dengan perlakuan lainnya. Hasil ini menunjukkan bahwa, semakin tinggi konsentrasi vitamin B kompleks yang ditambahkan pada medium produksi senyawa AMPs membuat aktivitas senyawa AMPs terhadap *E. coli* semakin rendah. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat disebabkan oleh adanya perubahan komposisi medium akibat penambahan vitamin. Medium MRS merupakan medium dasar untuk pertumbuhan BAL yang tidak hanya mengandung sumber karbon dan nitrogen, tetapi komposisi lain seperti *yeast extract* dan *beef extract*. *Yeast extract* merupakan produk hasil pemecahan sel *yeast* yang dapat diperoleh dari hasil samping produksi bir (*spent brewer's yeast*) melalui proses autolisis dan hidrolisis. *Yeast extract* dapat menjadi sumber vitamin, asam amino, dan mineral dalam medium pertumbuhan

bakteri (Difco & BBL, 2009). Oleh karena kandungan *yeast extract* sebagai sumber vitamin, maka penambahan vitamin B kompleks dalam medium dasar dapat membuat kandungan vitamin dalam media menjadi berlimpah, sedangkan vitamin menurut Leblanc *et al.* (2011), merupakan *trace element* yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit. Papagianni & Anastasiadou (2009)

menyatakan bahwa seluruh spesies dalam genus *Pediococcus* membutuhkan vitamin B, mangan (Mn) dan asam-asam amino dalam metabolismenya, akan tetapi hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi vitamin mungkin tidak diperlukan apabila medium dasar telah mengandung komponen sebagai sumber vitamin dan mineral seperti *yeast extract*.



Gambar 3.a Aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *E. coli* (huruf yang sama pada bakteri uji yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata)



Gambar 3.b Aktivitas Senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *B. cereus* (Huruf yang sama pada bakteri uji yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata).

Penurunan aktivitas senyawa AMPs akibat penambahan komponen tertentu pada medium MRS juga terjadi pada penelitian Anacarso *et al.* (2014). Semakin tinggi konsentrasi vitamin B₂, B₃ dan B₉ yang ditambahkan dalam medium MRS, aktivitas senyawa AMPs yang dihasilkan oleh *Enterococcus caseliflavus* semakin menurun. Penelitian Nasimuddin *et al.* (2017) menunjukkan bahwa penambahan vitamin B kompleks secara *in vitro* pada *disc* antibiotik dapat meningkatkan dan menurunkan aktivitas antibiotik dalam menghambat bakteri *Klasiella sp.* Peningkatan aktivitas terjadi pada *disc* antibiotik Imipenem dan

Piperacillin-tazobactam, sedangkan penurunan aktivitas terlihat pada antibiotik lain yang diujikan seperti Kloramfenikol dan Ciprofloxacin. Hal tersebut mengindikasikan bahwa, vitamin B kompleks yang ditambahkan pada *disc* antibiotik dapat bekerja secara sinergis maupun antagonis, sehingga dapat meningkatkan maupun menurunkan aktivitas antibiotik tersebut.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa senyawa AMPs yang dihasilkan oleh *P. pentosaceus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, yang merupakan bakteri Gram negatif. Menurut Cui *et al.*, (2012), struktur kimia

senyawa bakteriosin kelas II seperti *pediocin* yang dihasilkan oleh *P. pentosaceus* memiliki ikatan disulfida antara asam amino sistein dengan sistein yang menghasilkan sifat antibakteri pada senyawa tersebut. Daya hambat yang dihasilkan berkisar dari 7,0 mm – 9,25 mm yang termasuk dalam kategori daya hambat sedang, sesuai dengan pernyataan Wanja *et al.* (2020) apabila diameter zona hambat senyawa antimikroba berkisar 6-9 mm maka termasuk daya hambat sedang (intermediet).

Ampicilin sebagai kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 14,2 mm. Ampicilin bekerja dengan menghambat pembentukan dinding sel bakteri target. Sumampouw (2018) menyatakan bahwa, Ampicilin termasuk antibiotik β -lactam yang bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri target, baik Gram positif maupun Gram negatif, sehingga dinding sel target menjadi lemah dan lisis. Gambar 3.3 menunjukkan bahwa seluruh perlakuan memiliki aktivitas anti bakteri terhadap *B. cereus*, namun aktivitas tersebut lebih rendah dibanding kontrol positif. Hasil uji statistik diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,01 (<0,05) yang berarti aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* terhadap *B. cereus* memiliki beda yang nyata (menerima H1). Persentase aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* dengan antibiotik Ampicilin dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Data yang diperoleh pada Gambar 3.4 menunjukkan bahwa, zona hambat terbesar ada pada perlakuan K1 yakni sebesar 13,23 mm yang secara statistik tidak berbeda nyata dengan zona hambat pada perlakuan K0 dan K2, sementara zona hambat terkecil ada pada perlakuan K3 dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Penurunan aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* pada penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi vitamin B kompleks pada medium produksi senyawa AMPs membuat aktivitas senyawa AMPs terhadap *B. cereus* semakin rendah, ditandai dengan diameter zona hambat yang semakin kecil. Penurunan aktivitas tersebut dapat dipengaruhi oleh perubahan medium dasar (MRS) akibat penambahan vitamin. MRS merupakan medium sintetik yang digunakan untuk kultivasi BAL. Medium tersebut mengandung beberapa komponen seperti makronutrien (sumber karbon dan nitrogen), serta mikronutrien seperti vitamin dan mineral dari *yeast extract* dan *beef extract* (Difco & BBL, 2009).

Penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* memiliki aktivitas yang

kuat melawan *B. cereus*. Zona hambat yang terbentuk berkisar dari 10,2 – 12,3 mm, sehingga aktivitas antibakteri tersebut tergolong kuat, sesuai dengan klasifikasi aktivitas antibakteri oleh Wanja *et al.* (2020), yang menyatakan bahwa jika diameter zona hambat berkisar 10-15 mm maka aktivitas senyawa antimikroba tersebut tergolong kuat.

Senyawa AMPs yang dihasilkan oleh *P. pentosaceus* dikenal memiliki kemampuan antibakteri yang kuat terhadap bakteri Gram positif. Senyawa ini dapat bersifat bakterisidal dengan membentuk pori pada membran sel target melalui interaksi dengan reseptor pada membran sel target, yang akhirnya mengganggu permeabilitas sel dan menyebabkan kematian (Bahar & Ren, 2013). *Mannose phosphotransferase system* (Man-PTS) pada membran sel bakteri Gram positif menjadi reseptor spesifik senyawa bakteriosin. Secara filogenetik, Man-PTS terbagi menjadi 3 kelas/grup, dan hanya Man-PTS pada kelas/grup 1 yang berperan sebagai reseptor. Man-PTS pada bakteri Gram negatif termasuk dalam kelas/grup 2 dan 3 yang tidak berperan sebagai reseptor spesifik. Hal tersebut membuat bakteri Gram positif menjadi lebih sensitif terhadap senyawa bakteriosin (Colombo *et al.*, 2018).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa Vitamin B Kompleks tidak berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas senyawa AMPs dari *P. pentosaceus*, sementara penambahan dalam konsentrasi tinggi justru menurunkan aktivitas senyawa tersebut

Saran

Saran untuk penelitian ini adalah Produksi senyawa AMPs dari *P. pentosaceus* pada media MRS tidak membutuhkan penambahan atau suplementasi vitamin B kompleks. Untuk meningkatkan aktivitas senyawa tersebut dapat dilakukan tahap pemurnian agar mendapatkan senyawa *pediocin* murni dari *P. pentosaceus*

DAFTAR PUSTAKA

- Ahgilan, A., Sabaratnam, V. and Periasamy, V. 2016. Antimicrobial Properties of Vitamin B2 Antimicrobial Properties of Vitamin B2. *International Journal of Food Properties*. Taylor & Francis. 19 (5):1173–1181.
- Anacarso, I., Bondi, M., Mura, C., Nlederhausen, S., Iseppi R., Messi, P., Sabla, C., Condo, C. 2014. Culture Compounds which are Able to Increase the Growth and the Production

- of Bacteriocins by Two Different LABs. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 5(3):1-8.
- Anacarso, I., Bondi, M., Mura, C., Nlederhausen, S., Iseppi R., Messi, P., Sabla, C., Condo, C. 2014. Culture Compounds which are Able to Increase the Growth and the Production of Bacteriocins by Two Different LABs. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 5(3):1-8.
- Anand, S. P. and Sati, N. 2013. Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(7): 2496–2501.
- Anand, S. P. and Sati, N. 2013. Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(7): 2496–2501.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., Koidis, I. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99(13): 5384–5390.
- Azevedo, P.O.S., Converti, A., Gierus, M., Oliveira, R.P.S. 2018. Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance Produced By *Pediococcus pentosaceus*: From Shake Flasks To Bioreactor. *Molecular Biology Reports* 46(1): 461-46.
- Azevedo, P.O.S., Mendonca, C.M.N., Moreno, A.C.R., Bueno, A.V.L., Alemida, S.R.Y., Seibert, L., Converti, A., Watanabe, L., Gierus, M., Oliveira, R.P.S. 2020. Antibacterial And Antifungal Activity of Crude And Freeze Dried Bacteriocin Like Inhibitory Substance Produced by *Pediococcus pentosaceus*. *Scientific Reports* 2020(10): 1–14.
- Bahar, A.A & Ren, D. 2013. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals Journal* 6:1543-1575.
- Bakar, A. A., Rasol, R. M., Yahaya, N., Noor, N.M., Fahmy, M.K. 2015. Turbidity Method to Measure the Growth of Anaerobic Bacteria Related to Microbiologically Influenced Corrosion. *Solid State Phenomena*. Researchgate 227(1): 298-301.
- Bakar, A. A., Rasol, R. M., Yahaya, N., Noor, N.M., Fahmy, M.K. 2015. Turbidity Method to Measure the Growth of Anaerobic Bacteria Related to Microbiologically Influenced Corrosion. *Solid State Phenomena*. Researchgate 227(1): 298-301.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. 2016. Methods For In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Elsevier, 6(2) : 71–79.
- Bottone, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2): 382–398.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial Peptides: Pore Formers Or Metabolic Inhibitors In Bacteria. *Nature Review. Microbiology* 3(3) 238-250.
- Chatterjee, M., Jana, S. C., Raychauduri, U. 2018. Optimization of Media and Culture Conditions for Improved Production of Bacteriocin by Using Conventional One-Factor-At-A-Time (OFAT) Method. *Ecornicon Microbiology*15(4): 251–258.
- Colombo, N.S.R., Chalon, M.C., Navarro, S.A., Bellomio, A. 2018. Pediocin-like Bacteriocins: New Perspective on Mechanism of Action and Immunity. *Curr Genet* 64: 345-351.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, Y., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., Cui, H. 2012. Class Iia bacteriocins: Diversity and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(12): 16668–16707.
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, Y., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., Cui, H. 2012. Class Iia bacteriocins: Diversity and new developments. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(12): 16668–16707.
- Difco and BBL Team. 2009. *Manual of Microbiological Culture Media* Second Edition. New York: Becton, Dickinson and Company
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H. 2006. The Continuing Story of Class Iia Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(2): 564-582
- Fuente-Núñez, C., Silva, O.N., Lu, T.K., Franco, L. K. 2017. Antimicrobial Peptides: Role in Human Disease and Potential as Immunotherapies. *Pharmacology and Therapeutics* 178 (4): 132–140.
- Fuente-Núñez, C., Silva, O.N., Lu, T.K., Franco, L. K. 2017. Antimicrobial Peptides: Role in Human Disease and Potential as

- Immunotherapies. *Pharmacology and Therapeutics* 178 (4): 132–140.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.M., Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. Science Direct 120(1): 51–70.
- Garneau, S., Martin, N. I., Vederas, J. C. 2002. Two-peptide Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria'. *Biochimie* 84(6): 577–592.
- Ghosh, B., Sukumar, G., Ghosh, A. R. 2019. Purification and Characterization of Pediocin from Probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4, MTCC 12683'. *Folia Microbiologica*. Springer 5(2) :1-21
- Hogg, S. D. 2012. *Essentials Microbiology* 2nd edition. Willey-Blackwell, UK.
- Islam, M. A., Kabir, S. M. L., Rahman, M. T. 2017. Molecular Detection and Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Raw Milk Sold in Different Markets of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 14(2) :277–282.
- Jensen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. W. 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review* 19(3) :491–511.
- Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology* 49(11): 1749–1755.
- Kumar, Y., Kaur, K., Shahi, A.K., Kairam, N., Tyagi, S.K. 2017. Antilisterial, Antimicrobial and Antioxidant Effects of Pediocin and *Murraya Koenigii* Berry Extract in Refrigerated Goat Meat Emulsion. *Food Science and Technology*. Elsevier. 79(1): 135–144.
- Kumari, S. and Sarkar, P. K. 2016. *Bacillus cereus* Hazard and Control in Industrial Dairy Processing Environment. *Journal Food Control*. Elsevier. 69(4): 20–29.
- Ladha, G. and Jeevaratnam, K. 2020. Characterization of Purified Antimicrobial Peptide Produced by *Pediococcus pentosaceus* LJR1, and its Application in Preservation of White Leg Shrimp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer. 36(5):1-12.
- Leblanc, J. G., Laino, J.E., Valle, M.J., Vannini, V., Sinderen, D.V., Taranto, M.P., Valdez, G.F., Giori, G.S., Sesma, F. 2011. B-Group Vitamin Production by Lactic Acid Bacteria - Current Knowledge and Potential Applications. *Journal of Applied Microbiology* 111(6): 1297–1309.
- Leblanc, J. G., Laino, J.E., Valle, M.J., Vannini, V., Sinderen, D.V., Taranto, M.P., Valdez, G.F., Giori, G.S., Sesma, F. 2011. B-Group Vitamin Production by Lactic Acid Bacteria - Current Knowledge and Potential Applications. *Journal of Applied Microbiology*. 111(6): 1297–1309.
- Li, D., Ni, K., Pamg, H., Wang, Y., Cai, Y., Jin, Q. 2015. Identification and Antimicrobial Activity Detection of Lactic Acid Bacteria Isolated From Corn Stover Silage', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(5): 620–631.
- Luna-Guevara, J. J., Arenas-Hernandez, M.M., Pena C.M., Silva, J.L., Luna-Guevara, M.L. 2019. The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures. *International Journal of Microbiology*. 2019 (38) : 1-10
- Merck KGaA. 2019. Technical Data Sheet GranuCulture™ MRS Agar. https://www.emdmillipore.com/Web-USA/Site/en_CA/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA. 15 Januari 2020.
- Mulyani, S. Jenie, B.S.L., Kusumaningrum, H.D., Arief, I.I. 2019. Characterisation of Crude Bacteriocin Produced By *Pediococcus pentosaceus* 2A2 In Enriched Molasses Medium. *International Food Research Journal*. 26(2) :187–192.
- Nasimuddin, S., Malaiyan, J. and Kandaswamy, M. 2017. An In Vitro Study of Effect of Water Soluble Vitamin B Complex on Antimicrobial Activity of Antibiotics against *Klebsiella* species Isolated from Respiratory Sample. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 6 (10):2782–2787.
- Nghe, D. and Nguyen, T. 2014. Characterization of Antimicrobial Activities of *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4(05) :61–64.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S. 2009. Pediocins: The Bacteriocin of *Pediococci*. Source, Production, Properties and Applications. *Microbial Cell Factories* 16(1):1–16.
- Parada, J. L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. 2007. Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties And Use As Biopreservatives',

- Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3):521–542.
- Perez, R. H., Zendo, T. and Sonomoto, K. 2014. Novel Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria (LAB): Various Structures And Applications. *Microbial Cell Factories*. *BioMed* 13(1):1-19
- Plessas, S., Mantzourani, I. and Bekatorou, A. 2020. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* SP2 as Starter Culture on Sourdough Bread Making. *Journal Foods* 9(1):77
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M., Oliveira, R.P.S. 2017. *Pediococcus* spp.: An Important Genus Of Lactic Acid Bacteria And Pediocin Producers. *Biotechnology Advances*. Elsevier 35(3):361–374.
- Schellack, G. 2016. B-Complex Vitamin Deficiency and Supplementation. *Pharmaceutical Journal*. 82(4):1-6.
- Skariyachan, S. and Govindarajan, S. 2019. Biopreservation Potential Of Antimicrobial Protein Producing *Pediococcus* Spp. Towards Selected Food Samples In Comparison With Chemical Preservatives. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier 291(12): 189–196.
- Sumampouw, O.J. 2018. Uji Sensitivitas Antibiotik terhadap Bakteri *Eschericia coli* Penyebab Diare Balita di Kota Manado. *Journal of Current Pharmaceutical Sciences* 2(1):105-110.
- Tewari, A. and Abdullah, S. 2015. *Bacillus cereus* Food Poisoning: International and Indian Perspective. *Journal of Food Science and Technology*. 52(5): 2500–2511.
- Wanja, D.W., Mbuthia, P.G., Waruiru, R.M., Bebora, L.C., Ngowi, H.A., Nyaga, P.N. 2020. Antibiotic and Disinfectant Susceptibility Patterns of Bacteria Isolated from Farmed Fish in Kirinyaga Country, Kenya. *International Journal of Microbiology*: 1-8.
- Yang, S. C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. 2014. Antibacterial Activities Of Bacteriocins: Application In Foods and Pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology* 5(5): 1–10.