

**KARAKTERISASI GEN PENYANDI PEDIOSIN PAF-11
PADA *Pediococcus acidilactici* F-11*
[Characterization of the Pediocin PaF-11 Encoding Gene
in *Pediococcus acidilactici* F-11]**

Tri Marwati¹✉, Nur Richana², Ani Harmayani² dan Endang S Rahayu²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor

²Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta;

e-mail: watipasca@yahoo.com

ABSTRACT

Pediocin PaF-11 is a ribosomally synthesized antimicrobial peptide produced by *Pediococcus acidilactici* F-11. The objectives of this research is to find out the location and the nucleotide sequence of gene, which is involved in the production of pediocin PaF-11. Results showed that the pediocin PaF-11 from the cured cell of *P. acidilactici* F-11 loss the activity, suggested that the pediocin PaF-11 gene was carried in the plasmid. Agarose gel electrophoresis of *P. acidilactici* F-11 plasmid DNA with marker λ DNA/HindIII showed that pediocin PaF-11 gene was carried in 12 kb plasmid. Amplification pediocin PaF-11 gene from *P. acidilactici* F-11 showed that uncured *P. acidilactici* F-11 culture contain plasmid DNA, indicated by amplification of the papA gene (256 bp). Cured *P. acidilactici* F-11 culture, plasmid eliminated, indicated by no aplicon DNA detected. This result also suggested that pediocin PaF-11 gene in *P. acidilactici* F-11 was carried in plasmid. Nucleotide of pediocin PaF-11 encoding gene was sequenced : atgaaaaaa ttgaaaaatt aactgaaaaa gaaatggcca ataccattgg ttgtaaac tacgtaatg gggtaactg ttgcaaacat tctgctctg ttgactggg taagctacc actgcataa tcaataatgg agctatggca tgggctactg gtggacatca aggtaacat aatgctag. The alignment of that nucleotide sequence showed that pediocin PaF-11 encoding gene have the same sequence with pediocin PA.1 encoding gene in *P. acidilactici* PAC1.0 and *P. acidilactici* K10 and pediocin AcH encoding gene in *P. acidilactici* LB 42-923 and *P. parvulus* ATO77, and pediocin CP2 in *P. acidilactici* MTCC 5101.

Key words: pediocin PaF-11, *Pediococcus acidilactici* F-11, encoding genes, genes location, nucleotide sequence.

ABSTRAK

Pediocin PaF-11 merupakan peptida antimikrobia yang disintesis secara ribosomal yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* F-11. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lokasi dan sekuen nukleotida gen yang terlibat dalam produksi pediosin PaF-11. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses *curing* pada *P. acidilactici* F11 menyebabkan hilangnya aktivitas pediosin PaF-11 yang dihasilkan, mengindikasikan bahwa gen pediosin PaF-11 berada dalam plasmid. Hasil elektroforesis agarose DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 dengan marker λ DNA/HindIII menunjukkan bahwa gen *P. acidilactici* F-11 terbawa dalam plasmid 12 kb. Amplifikasi gen pediosin PaF-11 dari *P. acidilactici* F-11 menunjukkan bahwa kultur *P. acidilactici* F-11 tanpa *curing* mengandung DNA plasmid, diindikasikan dengan gen papA (256 bp). Pada kultur *P. acidilactici* F-11 dengan *curing*, plasmid tereliminasi, ditunjukkan oleh tidak terdeteksinya DNA aplikon. Hasil ini menunjukkan juga bahwa gen pediosin PaF-11 di bawa dalam plasmid. Diketahui bahwa sekuen nukleotida gen penyandi pediosin PaF-11 sebagai berikut : atgaaaaaa ttgaaaaatt aactgaaaaa gaaatggcca ataccattgg ttgtaaac tacgtaatg gggtaactg ttgcaaacat tctgctctg ttgactggg taagctacc actgcataa tcaataatgg agctatggca tgggctactg gtggacatca aggtaacat aatgctag. Hasil penjarangan urutan basa nukleotida menunjukkan bahwa gen penyandi pediosin PaF-11 pada *P. acidilactici* F-11 memiliki sekuen yang sama dengan gen penyandi pediosin PA.1 pada *P. acidilactici* PAC1.0 dan *P. acidilactici* K10, pediosin AcH pada *P. acidilactici* LB 42-923 dan *P. parvulus* ATO77, serta pediosin CP2 pada *P. acidilactici* MTCC 5101.

Kata kunci: pediosin PaF-11, *Pediococcus acidilactici* F-11, gen penyandi, lokasi gen, sekuen nukleotida

PENDAHULUAN

Pediocin PaF-11 merupakan bakteriosin yang dihasilkan oleh *Pediococcus acidilactici* F-11 yang disintesis secara ribosomal. Pediosin PaF-11 telah diketahui berpotensi sebagai pengawet pangan karena kemampuannya dalam mengendalikan pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen pangan, tetapi informasi genetiknya masih terbatas. Sedangkan karakteristik genetik secara molekuler merupakan salah satu informasi yang perlu dipertimbangkan dalam menentukan potensi *P. acidilactici* F-11 sebagai sel penghasil pediosin.

Proses sintesis pediosin AcH menurut Bukhtiyarova *et al.* (1994) melalui tahapan proses sebagai berikut: transkripsi mRNA gen *pap* dari plasmid pSMB 74, translasi transkrip ke protein prepediosin, translokasi prepediosin melalui membran sitoplasma, proses penghilangan peptida pemandu (*leader peptide*), pembentukan ikatan disulfida pada prepediosin sehingga terbentuk pediosin aktif dan ekskresi pediosin aktif melewati dinding sel. Pada proses sintesis pediosin, terdapat beberapa protein yang berperan penting, seperti protein papD yang berperan pada tahap translokasi

prepediosin maupun proses penghilangan peptida pemandu. Terdapat juga protein papC yang bersama-sama protein papD berperan meningkatkan efisiensi proses translokasi prepediosin. Menurut Drider *et al.* (2006) prepediosin diproduksi di dalam ribosom dan peptida induser dimatangkan dan dikeluarkan melalui ABC transporter. Peptida induse matang berinteraksi dengan reseptor histidin kinase (HK), dimana terjadi proses autofosforilasi pada sisi sitosoliknya. Pada proses ini grup fosfat ditransfer menuju respon regulator (RR), yang kemudian menjadi aktif sebagai aktivator transkripsi untuk gen pediosin.

Beberapa pediosin memiliki lokasi gen penyandi pada plasmid, seperti pediosin AcH/PA-1 pada *P. acidilactici* C20 (Halami *et al.*, 2000), pediosin CP2 pada *P. acidilactici* MTCC 5101 (Kaur dan Balgir, 2007), pediosin MM33/PA-1 pada *P. acidilactici* MM33 (Millette *et al.*, 2008) dan pediosin A pada *P. pentosaceus* FBB61 (Giacomini *et al.*, 2000), bakteriosin ST44AM pada *P. pentosaceus* ST44AM (Todorov dan Dicks, 2009), pediosin dari *P. pentosaceus* FBB63 (Graham dan McKay, 1985) dan dari *P. pentosaceus* FBB61 dan L7230 (Daeschel dan Klaenhammer, 1985). Ukuran plasmid pediosin ini bervariasi dari 8,9 kb (Kaur dan Balgir, 2007) sampai 15,7 kb (Graham dan McKay, 1985).

Untuk menentukan lokasi gen penyandi pediosin dapat dilakukan dengan proses *curing* plasmid sel produser dan menguji aktivitas supernatan yang dihasilkan. Tidak adanya aktivitas pada sampel yang *dicuring*, mengindikasikan bahwa lokasi gen penyandi terdapat pada plasmid (Todorov dan Dicks, 2009). *Curing* plasmid adalah usaha untuk menghilangkan plasmid dari sel produser tanpa mengganggu viabilitas sel. Pada saat *curing* terjadi penghambatan replikasi plasmid tanpa mengganggu replikasi kromosom, dan sebagai akibat dari proses pembelahan sel maka plasmid akan tereliminasi. *Curing* dapat terjadi secara spontan namun dapat lebih ditingkatkan dengan penggunaan agensia tertentu.

Pada penentuan lokasi gen penyandi *P. acidilactici* C20, *P. acidilactici* MM33 dan *P. pentosaceus* ST44AM, *curing* plasmid dilakukan dengan agensia novobiosin (Halami *et al.*, 2000; Millette *et al.*, 2008; Todorov dan Dicks, 2009), sedangkan untuk *P. acidilactici* MTCC 5101 digunakan etidium bromida (Kaur dan Balgir, 2007). Novobiosin mempunyai kemampuan untuk mengeliminasi DNA plasmid dengan melakukan penghambatan pada proses girase DNA (Wolfson *et al.*, 1983; Hooper *et al.*, 1984; Kornberg 1980 dalam Halami *et al.*, 2000). Novobiosin dapat menghambat aktivitas enzim dna girase (topoisomerase), yaitu enzim yang dapat menghilangkan pilinan positif (atau dengan kata lain menimbulkan pilinan negatif) yang terbentuk sewaktu terjadi replikasi dna (yaitu sewaktu garpu replikasi bergerak maju). Dengan demikian maka penambahan novobiosin ke dalam kultur bakteri yang sedang tumbuh menyebabkan penghambatan sintesis dna.

Marugg *et al.* (1992) mendapatkan seekuen nukleotida dari fragmen turunan plasmid pSRQ11 yang berhubungan dengan produksi pediosin PA-1 pada *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. Analisis seekuen nukleotida fragmen tersebut mengindikasikan adanya keberadaan empat gen (pedA, pedB, pedC, dan pedD). Gen pedA merupakan gen penyandi 62 asam amino prekursor pediosin PA-1. Gen pedB dan pedC mengkode berturut turut 112 dan 74 residu asam amino. Gen pedD mengkode 724 asam amino, dan protein yang dihasilkan terindikasi terlibat dalam proses translokasi pediosin PA-1. Motlagh *et al.* (1992) menemukan plasmid pembawa gen yang terlibat dalam produksi prepediosin AcH pada *Pediococcus acidilactici* H, yaitu plasmid PSMB 74. Selanjutnya Motlagh *et al.* (1994) melaporkan seekuen nukleotida lengkap dari pSMB74. Plasmid tersebut memiliki 8877 pasangan basa (bp). Empat gen berlokasi pada pSMB74 tersusun dalam 3500 bp. Keempat gen tersebut yaitu *pap A*, *pap B*, *pap C* dan *pap D* dan berturut turut mengkode 62, 112, 174 dan 724 asam amino. Asam amino yang dikode gen

papA merupakan prekursor pediosin AcH (prepediosin). Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa sekuen nukleotida gen penyandi pediosin PA-1 dan pediosin AcH memiliki sekuen sebagai berikut:

A T G A A A A A A T T G A A A A A A T -
 TAACTGAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGG
 TGGTAAATACTACGGTAATGGGGTTACTTGT
 GGCAAACATTCCTGCTCTGTTGACTGGGGTA
 AGGCTACCACTTGCATAATCAATAATGGAGC
 TATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGT
 AATCATAAATGCTAG. Gen penyandi pediosin PA.1 *P. acidilactici* K10 (Moon dan Kim, 2004) dan pediosin AcH *P. parvulus* ATO77 (Miller *et al.*, 2005) memiliki sekuen yang sama dengan yang tersebut di atas.

Pada penelitian ini dilakukan penentuan lokasi dan sekuen nukleotida gen penyandi pediosin PaF-11. Informasi genetik tersebut bermanfaat dalam mendukung pengembangan *P. acidilactici* F-11 sebagai sel penghasil pediosin PaF-11. Diduga bahwa gen penyandi pediosin PaF-11 berlokasi dalam plasmid dengan sekuen sama dengan pediosin yang telah dilaporkan sebelumnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Kultur *P. acidilactici* F-11 dan *Lactobacillus pentosus* LB42 masing masing digunakan 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 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% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,0056% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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%.

Curing plasmid sel *P. acidilactici* F-11

Pada proses *curing* terhadap sel *P. acidilactici* F-11 digunakan agensia novobiosin (Halami *et al.*, 2000; Millette *et al.*, 2008; Todorov dan Dicks, 2009). Novobiosin dilarutkan dengan air steril dan difiltrasi dengan membran berukuran 0,22mm. Kultur *P. acidilactici* F-11 ditumbuhkan pada media media TGE cair tanpa penambahan novobiosin (A) dan media TGE dengan penambahan novobiosin (B). Terhadap kultur (A) dan (B) yang telah diinkubasi selama 18 jam dilakukan ekstraksi pediosin, dan pediosin yang dihasilkan diamati aktivitas penghambatannya terhadap bakteri uji.

Uji aktivitas pediosin PaF-11

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar sumur yang dikembangkan Biswas *et al.* (1991). 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 uji *L. pentosus* LB42 berumur 18 jam sebanyak 40 ml dan didiamkan pada suhu 4°C selama 1 jam. Selanjutnya dibuat sumuran dan 20 ml pediosin PaF-11 dimasukkan ke dalamnya, selanjutnya disimpan pada suhu 4-5°C minimal selama 1 jam agar larutan pediosin terdifusi ke dalam media agar. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati zona penghambatannya.

Isolasi plasmid *P. acidilactici* F-11

Isolasi plasmid dilakukan terhadap kedua kultur *P. acidilactici* F-11 yaitu kultur (A) dan (B) mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989) dan Kalmokoff *et al.* (2003). Ukuran plasmid ditentukan dengan elektroforeresis gel agarose 1% pada 100V selama 1 jam dan menggunakan 1Kb DNA ladder sebagai standar berat molekul (Gonzales dan Kunka, 1987; Kaur dan Balgir, 2007). Visualisasi dilakukan setelah pewarnaan dengan larutan etidium bromida.

Amplifikasi Gen Pediosin PaF-11

Terhadap plasmid DNA *P. acidilactici* F-11

hasil diisolasi, dilakukan analisis PCR (Huang *et al.*, 2009; Todorov dan Dick, 2009). Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan gen dalam bakteri. Pada analisis ini digunakan dua primer nukleotida spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen *papA*. Disain primer berdasar sekuen gen *papA* yang ada di database GenBank menggunakan program *primer3* secara online (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Dari disain tersebut didapatkan Primer 1 (*Forward*) : 5'-GCGCGTATTAAGGATAATTT-3' dan Primer 2 (*Reverse*) : 5'-TTTATTGATGCCAGCTCAGC-3'.

DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 yang telah diisolasi kemudian digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk mengamplifikasi gen pediosin (*papA*). Total volume reaksi PCR adalah 20 ml yang mengandung 1 ul DNA plasmid, 10 mM dNTPs, 0,2 uM primer *Forward* dan *Reverse*, 1,5 mM MgCl₂, 1 unit enzim *Taq DNA polymerase* dalam larutan bufer PCR 1X (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 50% glycerol, 0,5%, Tween 20, dan 0,5% nonidet P40). Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR *Programable Thermal Controller* (MJ Research Incorporation, Massachusetts, USA). Program PCR untuk amplifikasi gen *papA* terdiri dari tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada 50°C selama 1 menit dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 1 menit dan siklus diakhiri dengan pemanjangan akhir pada 72°C

selama 5 menit. Uji molekuler teknik PCR terhadap DNA *P. acidilactici* F-11 sebagai konfirmasi terhadap gen *papA* dilakukan 3 kali ulangan.

Untuk konfirmasi plasmid sel *P. acidilactici* F-11 secara molekuler maka dilakukan isolasi plasmid terhadap kultur bakteri (A) dan (B). Selanjutnya kedua isolat digunakan sebagai cetakan untuk analisis amplifikasi DNA dengan metode analisis PCR seperti tersebut di atas.

Analisis Sekuen Nukleotida Gen *papA* dari Sel *P. acidilactici* F-11

Untuk memastikan bahwa hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid dari bakteri *P. acidilactici* F-11 adalah merupakan gen *papA* maka hasil amplifikasi disekuensing untuk mendapatkan sekuen nukleotida dari fragmen DNA tersebut. Sekuen nukleotida dilakukan dengan DNA *sequenser*. Sekuensing dilakukan terhadap dua produk PCR yaitu produk dengan primer *papA*-Forward dan produk dengan primer *papA*-Reverse. Dari hasil sekuensing produk dengan primer *papA*-Forward dapat diketahui sekuen nukleotida F dan dari produk dengan primer *papA*-Reverse setelah mengalami reverse complement dapat ditentukan sekuen nukleotida R. Untuk mendapatkan sekuen nukleotida utuh dari gen *papA* maka dilakukan overlapping sekuen F dan R tersebut. Urutan sekuen yang diperoleh selanjutnya dianalisis melalui penjajaran sekuen menggunakan perangkat Basic Local Alignment Search untuk mengetahui kedekatan urutan sekuen gen penyandi pediosin PaF-



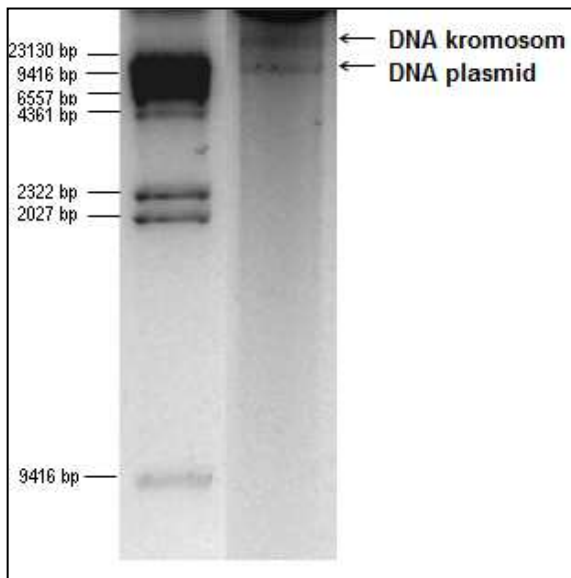
Gambar 1. Zonaambat pediosin PaF-11dari *P. acidilactici* F-11yang ditumbuhkan pada media TGE cair tanpa novobiosin (A) dan dengan novobiosin (B) terhadap *L. pentosus* LB42.

11 dengan sekuen penyandi pediosin PA-1 dan AcH yang telah terdaftar pada Genbank.

HASIL

Penentuan lokasi gen penyandi pediosin PaF-11 dapat dilakukan dengan proses *curing* plasmid sel produser dan menguji aktivitas pediosin yang dihasilkan. Zona hambat pediosin yang dihasilkan terlihat pada Gambar 1. Pediosin PaF-11 yang dihasilkan dari kultur yang ditumbuhkan pada media TGE tanpa penambahan novobiosin (A) mempunyai aktivitas penghambatan terhadap *L. pentosus* LB42 dengan ditunjukkan adanya zona bening. Selanjutnya pediosin yang dihasilkan dari kultur yang ditumbuhkan pada media TGE dengan penambahan novobiosin (B) tidak mempunyai aktivitas penghambatan, yaitu ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening.

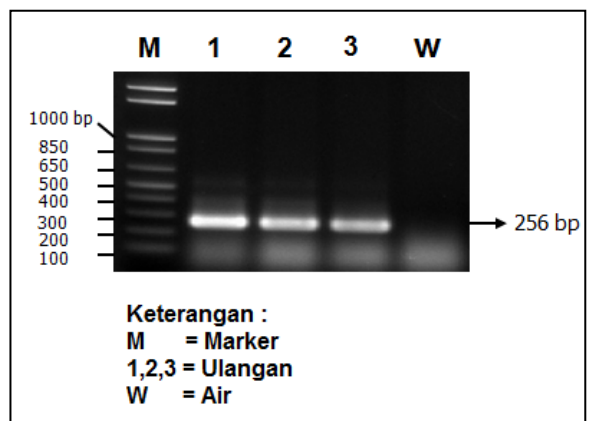
Ukuran plasmid *P. acidilactici* F-11 yang telah berhasil diisolasi menggunakan teknik lisis alkali ditentukan dengan elektroforesis gel agarose DNA gel agarose 1,5% dengan pembanding marker λ DNA/HindIII terlihat pada Gambar 2. Dari Gambar



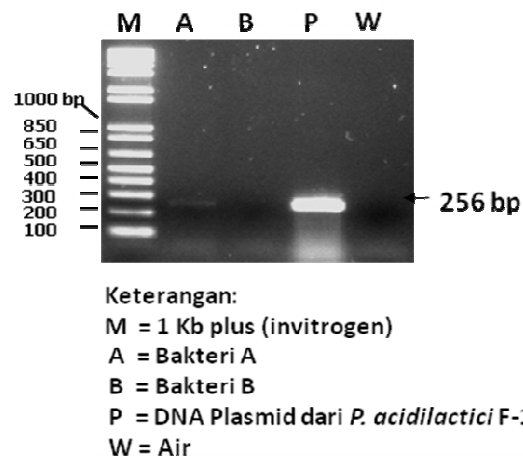
Gambar 2. Hasil isolasi DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 yang dielektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan pembanding marker λ DNA/HindIII.

tersebut terlihat bahwa pita DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 berada diantara pita penanda pembanding dengan ukuran 9416 bp dan 23130 bp. Dengan teknik interpolasi dari tujuh pita marka pembanding DNA λ DNA/HindIII yang digunakan diketahui bahwa DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 mempunyai ukuran \pm 12 kb.

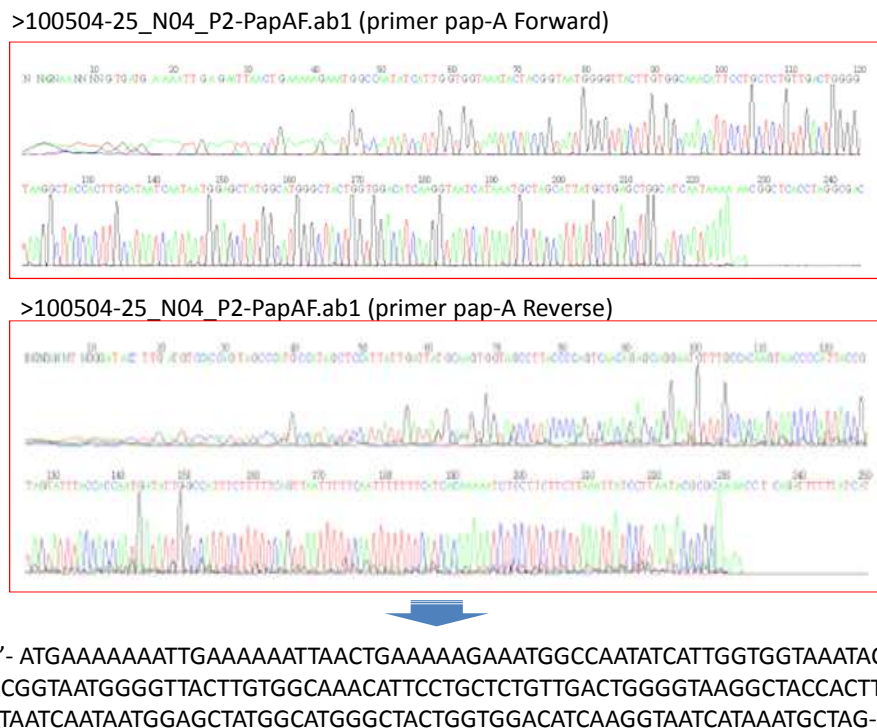
Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan gen dalam bakteri. Uji molekular teknik PCR terhadap DNA *P.*



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid *P. acidilactici* F-11



Gambar 4. Amplifikasi gen *papA* pada *P. acidilactici* F-11 ditumbuhkan pada media media TGE cair tanpa agensia *curing* (Bakteri A) dan media TGE dengan agensia *curing* novobiosin (Bakteri B)



Gambar 5. Hasil sekuensing gen *papA* yang diperoleh dari amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik dengan cetakan DNA plasmid *P. acidilactici* F-11

acidilactici F-11 sebagai konfirmasi terhadap gen *papA* dilakukan 3 kali ulangan. Hasil amplifikasi gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 terlihat pada Gambar 3.

Konfirmasi plasmid Sel *P. acidilactici* F-11 secara molekuler dilakukan dengan melakukan amplifikasi DNA menggunakan menggunakan cetakan DNA plasmid dari sel bakteri yang *dicuring* dan tidak *dicuring* dengan primer gen *papA*. Hasil Amplifikasi gen *papA* pada sel *P. acidilactici* F-11 yang tidak *dicuring* dan *dicuring* dapat dilihat pada Gambar 4.

Untuk memastikan bahwa hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid dari bakteri *P. acidilactici* F-11 adalah merupakan gen *papA* maka hasil amplifikasi disekuensing untuk mendapatkan sekuen nukleotida dari fragmen DNA tersebut. Hasil sekuensing fragmen DNA gen *papA*

ditampilkan pada Gambar 5. Diketahui bahwa sekuen nukleotida gen penyandi pediosin PaF-11 sebagai berikut : ATGAAAAAATTGAAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATACTACGGTAATGGGTTACTTGTGGCAAACATTCTGCTCTGTTGACTGGGGTAAGGCTACCACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCATAAATGCTAG.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian pada Gambar 1 menunjukkan bahwa gen penyandi produksi pediosin pada *P. acidilactici* F11 mempunyai lokasi dalam plasmid, sesuai pendapat Todorov dan Dicks (2009), bahwa tidak adanya aktivitas pada sampel yang *dicuring*, mengindikasikan bahwa lokasi gen penyandi terdapat pada plasmid. Hasil penelitian tersebut sama dengan yang ditemukan pada pediosin

AcH/PA-1, CP2, MM33/PA-1, A, bakteriosin ST44AM, yang berturut turut berasal dari *P. pentosaceus* FBB63, *P. pentosaceus* FBB61 dan L7230 (Halami *et al.*, 2000; Kaur dan Balgir, 2007; Millette *et al.*, 2008; Todorov dan Dicks, 2009; Graham dan McKay, 1985; Daeschel dan Klaenhammer, 1985)

Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa novobiosin mempunyai kemampuan sebagai bahan *curing* untuk sel *P. acidilactici* F-11. Kemampuan tersebut telah dibuktikan juga pada *curing* plasmid *P. acidilactici* C20 (Halami *et al.*, 2000), *P. acidilactici* MM33 (Millette *et al.*, 2008), *P. pentosaceus* ST44AM (Todorov dan Dicks, 2009). Novobiosin mempunyai kemampuan untuk mengeliminasi DNA plasmid dengan melakukan penghambatan pada proses *girase* DNA (Wolfson *et al.*, 1983; Hooper *et al.*, 1984; Kornberg 1980 dalam Halami *et al.*, 2000). Dengan adanya proses *curing* maka terjadi penghambatan replikasi plasmid tanpa meangganggu replikasi kromosom, dan sebagai

akibat dari pembelahan sel maka plasmid akan tereliminasi. Ketika plasmid sudah tereliminasi dari sel, maka gen penyandi produksi pediosin ikut tereliminasi, sehingga sel tidak dapat memproduksi pediosin lagi. Dengan demikian maka tidak ada lagi aktivitas penghambatan pada pediosin yang dihasilkan dari kultur yang *dicuring* dengan novobiosin.

DNA plasmid hasil isolasi dari *P. acidilactici* F-11 mempunyai ukuran ± 12 kb berdasarkan marka DNA λ DNA/HindIII (Gambar 2). Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa DNA plasmid dari *pentosaceus* FBB63 mempunyai ukuran 15,7 kb (Graham dan McKay, 1985), *P. pentosaceus* FBB61 (ATCC43200) mempunyai ukuran 9,4 kb (Giacomini *et al.*, 2000) dan plasmid dari *P. acidilactici* MTCC 5101 mempunyai ukuran 8,9 kb (Kaur dan Balgir, 2007).

Hasil amplifikasi DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 menggunakan pasangan primer yang spesifik

Tabel 1. Penjajaran urutan basa nukleotida gen penyandi pediosin PaF-11 pada *P. acidilactici* F-11 dengan basa nukleotida gen penyandi pediosin PA.1 pada *P. acidilactici* PAC1.0 (Marugg *et al.*, 1992) dan *P. acidilactici* K10 (Moon dan Kim, 2004), pediosin AcH pada *P. acidilactici* LB 42-923 (Motlagh *et al.*, 1994) dan *P. parvulus* ATO77 (Miller *et al.*, 2005), dan pediosin CP2 pada *P. acidilactici* MTCC 5101 (Balgir *et al.*, 2009). Tanda garis vertikal (|) melambangkan kesamaan sekuen yang disejajarkan

<i>P. acidilactici</i> F-11	1	ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	60
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0		ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	
<i>P. acidilactici</i> LB42-923		ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	
<i>P. acidilactici</i> K 10		ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	
<i>P. acidilactici</i> MTCC 5101		ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	
<i>P. parvulus</i> ATO77		ATGAAAAAAAAATTGAAAAATTAAGTAAAAAGAAATGGCCAATATCATTGGTGGTAAATAC	
<i>P. acidilactici</i> F-11	61	TACGGTAATGGGGTTACTTGTGGCAACATTCCTGCTCTGTTGACTGGGGTAAGGCTACC	120
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0		ACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCAT	
<i>P. acidilactici</i> LB42-923		ACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCAT	
<i>P. acidilactici</i> K 10		ACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCAT	
<i>P. acidilactici</i> MTCC 5101		ACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCAT	
<i>P. parvulus</i> ATO77		ACTTGCATAATCAATAATGGAGCTATGGCATGGGCTACTGGTGGACATCAAGGTAATCAT	
<i>P. acidilactici</i> F-11	181	AAATGCTAG	189
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0		AAATGCTAG	
<i>P. acidilactici</i> LB42-923		AAATGCTAG	
<i>P. acidilactici</i> K 10		AAATGCTAG	
<i>P. acidilactici</i> MTCC 5101		AAATGCTAG	
<i>P. parvulus</i> ATO77		AAATGCTAG	
		AAATGCTAG	

untuk gen *papA* menunjukkan bahwa DNA plasmid (3 ulangan) tersebut mengandung gen *papA* yang diindikasikan dengan hasil amplifikasi PCR yang positif. Dari Gambar 3 tersebut terlihat bahwa pita hasil amplifikasi gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 berada diantara pita penanda pembanding dengan ukuran 200 bp dan 300 bp. Dengan teknik interpolasi dari delapan pita marka yang digunakan diketahui bahwa hasil amplifikasi gen *papA* dengan cetakan DNA plasmid *P. acidilactici* F-11 mempunyai ukuran 256 bp. Ukuran ampikon yang dihasilkan sama dengan yang diharapkan yaitu ± 256 bp.

Hasil konfirmasi (Gambar 4) menunjukkan bahwa pada sel-sel yang tidak dicuring masih mengandung DNA plasmid atau dengan kata lain DNA plasmidnya masih ada. Hal ini diindikasikan dengan teramplifikasi gen *papA* (berukuran 256 bp) dimana gen tersebut terdapat pada DNA plasmid. Sedangkan pada sel-sel yang telah dicuring, DNA plasmidnya telah hilang yang diindikasikan dengan tidak terbentuknya ampikon DNA dari gen *papA*.

Dari hasil sekuensing (gambar 5) terlihat bahwa sekuen nukleotida yang diperoleh merupakan sekuen utuh dari fragmen DNA hasil amplifikasi (gen *papA*). Untuk melihat bahwa gen *papA* yang telah diperoleh dari DNA plasmid bakteri *P. acidilactici* F-11 merupakan gen *papA* yang benar, maka sekuen nukleotida yang telah diperoleh dibandingkan dengan sekuen gen yang sama pada database GenBank.

Penjajaran urutan basa nukleotida gen penyandi pediosin PaF-11 pada *P. acidilactici* F-11 dengan basa nukleotida gen penyandi pediosin PA.1 pada *P. acidilactici* PAC1.0 (Marugg *et al.*, 1992) dan *P. acidilactici* K10 (Moon dan Kim, 2004), pediosin AcH pada *P. acidilactici* LB 42-923 (Motlagh *et al.*, 1994) dan *P. parvulus* ATO77 (Miller *et al.*, 2005), dan pediosin CP2 pada *P. acidilactici* MTCC 5101 (Balgir *et al.*, 2009), menunjukkan persentase kesamaan sebesar 100%, seperti terlihat pada Tabel 1. Hasil ini mengindikasikan bahwa gen *papA* dari bakteri *P. Acidilactici* F-11 adalah benar-benar merupakan gen penyandi pediosin.

KESIMPULAN

Lokasi gen penyandi pediosin PaF-11 pada *P. acidilactici* F-11 berada pada plasmid dengan ukuran ± 12 kb. Hasil penjajaran urutan basa nukleotida menunjukkan bahwa gen penyandi pediosin PaF-11 pada *P. acidilactici* F-11 adalah sama dengan gen penyandi pediosin PA.1 pada *P. acidilactici* PAC1.0 dan *P. acidilactici* K10, pediosin AcH pada *P. acidilactici* LB 42-923 dan *P. parvulus* ATO77, serta pediosin CP2 pada *P. acidilactici* MTCC 5101.

DAFTAR PUSTAKA

- Balgir PP and B Kaur. 2009. Sequence analysis and homology-based modeling to assess structure-activity relationship of pediocin CP2 of *Pediococcus acidilactici* MTCC 5101. Submitted (MAY-2009) to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE. Strain: MTCC 5101 EMBL ACS70931.1.
- Biswas SR, P Ray, MC Johnson and B Ray. 1991. Influence of growth condition on the production of bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(4), 1265-1267.
- Bukhtiyarova M, R Yang and B Ray. 1994. Analysis of the pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3405-3408.
- Daeschel MA and TR Klaenhammer. 1985. Association of 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(6), 1538-1541.
- Dridr D, G Fimland, Y Hechard, LM McMullen and H Prevost. 2006. The continuing story of class IIa Bacteriocins. *Microbiology Molecular Biology Review* **70**(2), 564-582.
- Giacomini A, A Squartini and MP Nuti. 2000. Nucleotide sequence and analysis of plasmid pMD136 from *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC43200) involved in pediocin A production. *Plasmid* **43**(2), 111-122.
- Gonzales CF and BS Kunka. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 2534-2538.
- Graham DC and LL McKay. 1985. Plasmid DNA in Strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(2), 532-534
- Halami PM, A Ramesh and A Chandrashekar. 2000. Megaplasmid encoding novel sugar utilizing phenotypes, pediocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* C20. *Food Microbiology* **17**, 475-83.
- Huang Y, Y Luo, Z Zhai, H Zhang, CH Yang, H Tian, Zheng Li, J Feng, H Liu and Y Hao. 2009. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *P. pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control* **20**(11), 1030-1035.
- Hooper DC, JS Wolfson, GL McHugh, MD Swartz, C Tung and MN Swartz. 1984. Elimination of plasmid pMG110 from *Escherichia coli* by novobiocin and other inhibitors of DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**(5), 586-590.

- Kalmokoff ML, TD Cyr, MA Hefford, MF Whitford and RM Teather. 2003.** Butyrylvibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by ruminal anaerobe *Butyrvibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Canadian Journal of Microbiology* **49(12)**, 763-773.
- Kaur B and PP Balgir. 2007.** Pediocin CP2GENE localisation to plasmid PCP289 of *Pediococcus acidilactici* MTCC 5101. *The Internet Journal of Microbiology* **3(2)**.
- Marugg JD, CF Gonzalez, BS Kunka, AM Ledebuer, MJ Pucci, MY Toonen, SA Walker, LC Zoetmulder and PA Vandenberg. 1992.** Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology*. **58(8)**, 2360-2367
- Miller KW, P Ray, T Steinmetz, T Hanekamp and B Ray. 2005.** Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Letters in Applied Microbiology* **40**,56-62.
- Millette M, C Dupont, F Shareck, MT Ruiz, D Archambault and M Lacroix. 2008.** Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*, **104(1)**, 1632-1638.
- Moon GS and WJ Kim. 2004.** Characterization of pediocin operon in *Pediococcus acidilactici* K10. Submitted (AUG-2004) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE. Strain: K10 EMBL AAT95422.1.
- Motlagh A, AK Bhunia, F Szostek, TR Hansen, MC Johnson and B Ray. 1992.** Nucleotide and amino acid sequence of pap-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. *Letters in Applied Microbiology* **15**, 45-48.
- Motlagh A, M Bukhtiyarova and B Ray. 1994.** Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* **18**, 305-312.
- Sambrook J, EF Fritsh and T Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Todorov SD and LMT Dicks. 2009.** Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology* **132(2-3)**, 117-26.
- Wolfson JS, DC Hooper, MN Swartz, MD Swartz and GL McHugh. 1983.** Novobiocin-induced elimination of F⁺lac and mini-F plasmids from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **156(3)**, 1165-1170.