

Artikel Penelitian

Karakterisasi Plantarisin IIA-1A5 sebagai Antimikroba dan Evaluasi Aktivitas Sediaan Kering Beku Terenkapsulasi

Characterization of Plantarisin IIA-1A5 as Antimicrobial substances and Evaluation of Acitivity of Freeze-dried Microencapsulated Preparation

Mohammad Sridresta Soenarno¹, Irma Isnafia Arief^{1*}, Cece Sumantri¹, Epi Taufik¹, Lilis Nuraida²

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

*Korespondensi dengan penulis (irmaisnafia@gmail.com)

Artikel ini dikirim pada tanggal 23 Juli 2019 dan dinyatakan diterima tanggal 11 Februari 2020. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/jatp>. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists® ©2020

Abstrak

Bakteriosin adalah peptida dengan aktivitas antibakteri yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dan digunakan sebagai pengawet alami. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 memproduksi bakteriosin yang diberi nama Plantarisin IIA-1A5 pada medium pertumbuhan yang dibuat dari whey yang diperkaya skim. Untuk aplikasi sebagai pengawet alami dan untuk memperbaiki masa simpan dan aktivitas anti mikrobanya, plantarisin perlu dienkapsulasi dan dikeringbekukan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi dan mengevaluasi aktivitas antimikroba dari sediaan plantarisin IIA-1A5 yang terpurifikasi parsial dan terenkapsulasi kering beku. Ekstraksi dan purifikasi dari bakteriosin dimulai dengan presipitasi dengan ammonium sulfat, yang diikuti dengan dialysis, dan penukar kation kromatografi. Purifikasi parsial dari plantarisin kemudian dimikroenkapsulasi dengan maltodextrin kemudian dilanjutkan dengan proses kering beku. Berdasarkan pada SDS-PAGE, fraksi protein ke-7 (F7) dari plantarisin yang dipurifikasi parsial memiliki pita tunggal dan berat molekul sekitar 9,65 kDa. Konfirmasi lebih lanjut dengan menggunakan MALDI-TOF MS, ternyata pita tunggal tersebut terdiri dari 5 peptida yang diidentifikasi berbobot molekul masing-masing sebagai berikut 5,5, 7,80, 7,96, 9,09, dan 9,27 kDa. Plantarisin kering beku memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* tiga kali lipat dibandingkan dengan aktivitas antimikroba dari supernatan bebas sel, dan lebih tinggi dibandingkan dengan nisin, namun kurang bila dibandingkan dengan antibiotik ampisilin dan penisilin. Kesimpulannya, aktivitas antimikroba plantarisin kering beku dapat ditentukan dan lebih tinggi dibandingkan dengan nisin, ampisilin dan penisilin.

Kata kunci: plantarisin, mikroenkapsulasi kering beku, aktivitas antimikroba, *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5

Abstract

Bacteriocins are peptides with antibacterial activity produced by lactic acid bacteria and used as natural preservatives. Previous studies showed that Lactobacillus plantarum IIA-1A5 produces bacteriocin named plantaricin IIA-1A5 in the medium consisting whey enriched with skim milk. For application as food preservatives and to improve its shelf-life and activity, plantaricin was needed to be microencapsulated and freeze dried. The objective of this research was to characterize and evaluate the activity of partially purified freeze dried microencapsulated plantaricin IIA-1A5. Characterisation of partially purified plantaricin IIA-1A5 includes the identification of active fractions and molecular weight, evaluation of activity at different stage of purification and evaluation of antimicrobial activity of freeze dried microencapsulated plantaricin IIA-1A5. Extraction and purification of the bacteriocins started with precipitation with ammonium sulfate, followed by dialysis, and cation exchange chromatography. The partial purified of plantaricin was then microencapsulated in maltodextrin followed by freeze drying. Based on SDS-PAGE, the protein fraction F7 of partially purified plantaricin had a single band and molecular weight about 9.65 kDa. Further analyses using MALDI-TOF, it revealed that five peptides were identified from one single band plantaricin with molecular weight 5.5, 7.80, 7.96, 9.09, and 9.27 kDa, respectively. The freeze dried plantaricin freeze showed antimicrobial activity against Staphylococcus aureus three times stronger as compared to the activity of cell free supernatant, and was higher than nisin, but less than antibiotic ampicillin and penicillin. As conclusion, the activity of freeze dried plantaricin could be determined and had a higher value than nisin, ampicillin and penicillin.

Keywords: plantaricin, microencapsulated freeze dried, antimicrobial activity, *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5

Pendahuluan

Pengawetan kimia jika digunakan melebihi dosis yang ditetapkan dan juga paparan ke manusia terjadi secara kontinyu disinyalir dapat berpengaruh terhadap kesehatan termasuk memicu penyakit kanker pada

manusia (Yang *et al.*, 2014). Maka dibutuhkan pengawet lain dari bahan alami untuk mencegah efek yang merugikan tersebut. Bakteri asam laktat atau BAL dikenal memiliki potensi untuk memproduksi senyawa antimikroba, eksopolisakarida, dan senyawa

penghambat seperti bakteriosin yang mampu menghambat bakteri patogen (Trang Le *et al.*, 2019).

Bakteriosin sudah banyak dan lama diidentifikasi oleh para peneliti dan dianggap sebagai produk alami berbentuk protein atau peptida dari bakteri pada makanan fermentasi atau non-fermentasi. Mikroorganisme seperti BAL penghasil bakteriosin dapat digunakan sebagai *starter culture* atau *co-culture* dalam proses produksi pangan guna meningkatkan cita rasa dan memperpanjang umur simpan. Selain itu banyak bakteri penghasil bakteriosin yang diisolasi dari makanan atau bahan mentahnya (Yang *et al.*, 2014). *Lactobacillus plantarum* menghasilkan antimikroba seperti plantarisin A, plantarisin B, plantarisin C, plantarisin C19, plantarisin F, plantarisin S, plantarisin T, plantarisin LC74, plantarisin SA6, plantarisin 149, plantarisin 154, plantarisin UG1, dan plantarisin KW30 (Trang Le *et al.* 2019) termasuk *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 yang dapat diisolasi dari daging sapi dan telah berhasil dibuktikan memiliki sifat probiotik (Arief *et al.*, 2015), sifat fungsional lainnya diantaranya hipokolesterol (Burhan *et al.*, 2017) serta menghasilkan peptida bioaktif (Hanifah *et al.*, 2015).

Penelitian yang dilakukan Arief *et al.* (2015) menggunakan media pertumbuhan media *de Man Rogosa Sharp-broth* (*MRS-broth*) menghasilkan plantarisin IIA-1A5 yang merupakan senyawa peptida dengan berat molekul 6,4 kDa. Plantarisin ini dapat didegradasi oleh enzim proteolitik tripsin dan pepsin, serta bersifat tahan panas serta masih aktif pada pH asam maupun basa. Plantarisin IIA-1A5 tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk makanan baik bakteri Gram positif maupun Gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* serta *Staphylococcus aureus*. Plantarisin IIA-1A5 mempunyai mekanisme aksi antimikroba secara bakterisidal dengan merusak membran sel yang menyebabkan materi organik dan anorganik dalam sel target keluar dan akhirnya sel lisis (Arief *et al.*, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa Plantarisin IIA-1A5 mampu berfungsi sebagai pengawet alami untuk produk pangan (Arief *et al.*, 2013).

Produksi plantarisin IIA-1A5 masih menggunakan media sintetis berupa *de Man Rogosa Sharp-broth* (*MRS-broth*) yang harganya relatif mahal sehingga menjadi kendala jika ingin diproduksi skala industri. Fatmarani *et al.* (2018) melaporkan bahwa plantarisin IIA-1A5 dapat diproduksi dengan media whey keju yang merupakan hasil samping dari pengolahan industri keju. Hasil penelitian Soenarno *et al.* (2019) menunjukkan bahwa media pertumbuhan whey yang ditambah susu skim merupakan media pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 dalam memproduksi senyawa antimikroba terbaik dibandingkan dengan media whey dan *buttermilk*.

Penyimpanan bakteriosin dalam keadaan segar tidak dapat dilakukan untuk jangka waktu yang lama, sehingga perlu adanya metode pengawetan bakteriosin yang dapat mempertahankan stabilitasnya sehingga dapat diaplikasikan. Metode stabilitas pengawetan

bakteriosin paling baik dilakukan dengan metode pengeringan beku. Pengeringan beku merupakan teknik pengawetan yang umum digunakan untuk mempertahankan atau mengawetkan kultur bakteri asam laktat. Teknik mikroenkapsulasi digunakan untuk meningkatkan konsentrasi sel bakteri dan memperbaiki produksi antimikroba (Okuro *et al.*, 2013). Proses pembuatan kapsul microencapsulasi dengan menggunakan beberapa tehnik diantaranya *co-accretion*, *co-crystallization*, *moleculer inclusion*, *spray drying*, *spray cooling*, *chilling*, *extrusion*, dan *fluidized*. Penggunaan tehnik tersebut tergantung pada tipe bahan yang akan dienkapsulasi, cara pengaplikasian, dan mekanisme pelepasan bahan aktif (Trang Le *et al.*, 2019). Pengujian bakteriosin media whey keju dan kondisi penyimpanan bakteriosin menggunakan pengawetan kering beku belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian terkait hal tersebut. Pemilihan whey keju sebagai alternatif terbaik untuk media pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* dan produksi bakteriosin berdasarkan beberapa hasil penelitian diantaranya : whey adalah hasil ikutan pembuatan keju dengan persentase hasil pembuatan keju yaitu sebesar 80% whey dan 20% keju (Soenarno *et al.*, 2019); whey keju masih memiliki unsur protein yang diperlukan untuk produksi protein bakteriosin, asam amino yang ada dalam whey merupakan asam amino bebas yang digunakan untuk sintesa bakteriosin dalam sel bakteri (Soenarno *et al.*, 2019; Fatmarani *et al.*, 2018). Kandungan protein whey sebagian besar terdiri dari β -lactoglobulin (β -Lg) and α -lactalbumin (Patel, 2015; Ganju and Gogate, 2007). Fatmarani *et al.* (2018) juga menggunakan whey keju gauda dan keju mozzarella untuk pertumbuhan *L. plantarum* dan produksi bakteriosin dan berhasil mendapatkan bakteriosin plantarisin dengan kadar protein sebesar 29,88 ppm sampai 32,57 ppm. Whey juga digunakan untuk pembuatan minuman fermentasi dengan starter *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan menghasilkan minuman fungsional yang mempunyai kandungan asam amino yang tinggi (Pescuma *et al.*, 2010). Gillespie *et al.* (2015) dan Patel (2015) menyatakan bahwa whey digunakan sebagai minuman fungsional untuk penderita diabetes.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan pemurnian plantarisin IIA-1A5 secara bertahap mulai dari presipitasi ammonium sulfat dan kromatografi pertukaran kation, selanjutnya dikeringbekukan sehingga menjadi kristal plantarisin. Karakterisasi protein dan aktivitas antimikroba dari hasil pemurnian plantarisin IIA-1A5 menjadi informasi terbaru mengenai plantarisin yang berhasil diproduksi dari media whey yang ditambah susu skim.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan selama 16 bulan sejak bulan September 2017 sampai November 2018. Penelitian ini berlokasi di Laboratorium Analisis Hasil Ternak Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan IPB. Untuk analisis dengan menggunakan MALDI-TOF dilakukan di Kagawa

University, Jepang pada bulan Agustus–September 2018.

Purifikasi Plantarisin

Purifikasi Parsial dengan menggunakan Amonium Sulfat (Arief *et al.*, 2015). Sebanyak 1000 ml whey diinokulasi dengan 10% kultur *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media yang telah ditumbuhi *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C untuk mendapatkan supernatan bebas sel (SBS). Supernatan disaring menggunakan membran saring Minisart diameter 0,20 µm, dan pH supernatan dinetralkan dengan NaOH 1N menjadi 5,8-6,2. Supernatan dievaporasi dengan menggunakan Heidolph VV *micro evaporator* sampai volumenya menjadi setengah dari volume awal. Supernatan dijenuhkan dengan serbuk amonium sulfat dan disentrifuge dengan kecepatan 600 rpm selama 20 menit untuk mendapatkan presipitat plantarisin. Seluruh tahapan ini dilakukan pada suhu 4°C.

Tahap Dialisis

Presipitat plantarisin didialisis dengan menggunakan membran dialisis berdiameter 10 µm dan direndam dalam buffer *potassium phosphate* selama 12 jam. Buffer diganti sebanyak 3 kali yaitu pada jam kedua, keempat, dan keenam. Proses dialisis ini dilakukan pada suhu 4°C (Arief *et al.*, 2015).

Purifikasi dengan Kromatografi Penukar Kation

Purifikasi lanjut dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Penukar kation (Arief *et al.*, 2015). Kolom HiTrap SP XL (GE Healthcare Life Science) volume 5 mL dibilas dengan *aquabidest* sebanyak tiga kali volume kolom dan buffer A (20 mM buffer fosfat pH 6,0) sebanyak empat kali volume kolom. Sampel plantarisin dimasukkan ke dalam kolom SP XL dengan bantuan *syringe* secara pelan-pelan dan pada saat memasukkan ke kolom, ada larutan yang menetes di bawah ditampung di tabung reaksi disebut FT (*Flow Trough*). Campuran buffer A dan buffer B (buffer fosfat 20 mM pH 6,0 NaCl 0,5 M) yang dibagi ke dalam fraksi LE1, LE2, LE3, LE4, LE5, LE6, LE7, LE8, LE9, dan LE10, LE11, LE12, LE13, LE14 dimasukkan secara bertahap untuk mengeluskan protein plantarisin yang terikat pada kolom dan bagian yang menetes dari kolom disebut plantarisin murni ditampung dengan tabung reaksi. Seluruh tahapan ini dilakukan pada 4°C. Konsentrasi plantarisin hasil kromatografi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 280 nm.

Penentuan Berat Molekul Plantarisin

Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui massa molekul protein plantarisin murni hasil kromatografi dengan menggunakan konsentrasi *polyacrilamide* 6% pada *stacking gel* (gel penggertak) dan 15% pada *resolving gel* (gel pemisah). *Band* yang muncul dibandingkan dengan marker sehingga akan diketahui

berat molekul protein dan fraksi yang mengandung plantarisin murni.

Penentuan Kadar Protein

Kadar protein plantarisin murni ditentukan berdasarkan metode *Lowry* (Lowry, 1951). Sebanyak 100 µl sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquades steril hingga mencapai 4 ml. Setelah itu ditambahkan 5,5 ml pereaksi Lowry A (50 ml Na₂CO₃ 2% (w/v) dalam NaOH 0,1 N ditambah CuSO₄·5H₂O 0,5% (w/v) dalam natrium kalium tartarat 1%. Kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml pereaksi B (Folin-Ciocalteu), lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 650 nm. Kurva standar dibuat dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* dengan konsentrasi protein 0,25 mg/ml.

Identifikasi Bobot Molekul Protein

Identifikasi bobot ini dilakukan dengan menggunakan *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization time-of-flight* (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (Counterman *et al.*, 2003). Preparasi sampel menggunakan zip-tip untuk menghilangkan fosfat yang terdapat dalam sampel plantarisin cair. Zip-Tip dibilas sebanyak 3 kali dengan 0,1% trifluoroacetic acid (TFA) dalam asetonitril sebanyak 10 µl kemudian dibilas kembali dengan 0,1% TFA sebanyak 3 kali. Selanjutnya sampel berupa plantarisin cair dihisap dan dilepaskan kembali melalui Zip-Tip dengan *pipeting* sebanyak 20 kali. Zip-tip dibilas kembali sebanyak 3 kali pada 0,1% TFA. Kemudian dioleskan di atas *ground plate*. Pengolesan dilakukan secara merata sampai membentuk lapisan tipis. Sampel dibiarkan mengering pada suhu ruang sekitar 1 menit. Kemudian, sampel yang telah kering dilapisi dengan 1 µl larutan matriks HCCA dalam 50% asetonitril dan 0,1% TFA. Sampel dibiarkan mengering dan terkristalisasi pada suhu ruang sekitar 10 menit. Selanjutnya *ground plate* dimasukkan ke dalam *socket* pada MALDI-TOF tipe ultraflex TOF/TOF (Bruker) dengan jumlah tembakan sebanyak 6.000 kali.

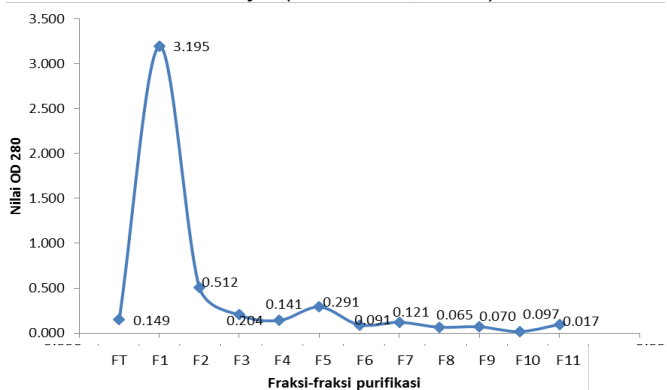
Pembuatan Plantarisin Kering Beku Enkapsulasi

Metode yang digunakan pada tahap ini adalah sesuai dengan peneliti sebelumnya (Nilsang 2010; Pingitore *et al.*, 2012). Sebanyak 2% (b/v) maltodekstrin steril ditambahkan ke dalam plantarisin IIA-1A5 cair kemudian diaduk secara merata dengan pengaduk magnet selama 30 menit pada suhu dingin. Campuran yang telah terdispersi kemudian diteteskan secara perlahan ke dalam 200 ml larutan CaCl₂ 0,1M dengan menggunakan *syringe* 21G. Manik-manik maltodekstrin dapat terbentuk setelah tetesan campuran maltodekstrin-plantarisin IIA-1A5 masuk ke dalam larutan CaCl₂, kemudian diaduk perlahan selama 30 menit. Setelah pengadukan selesai, manik-manik tersebut disaring kemudian dibilas dengan menggunakan aquades steril lalu ditempatkan didalam wadah steril untuk disimpan dalam suhu -20°C yang

selanjutnya dikeringbekukan dengan metode *freeze drying*. Manik-manik maltodekstrin-plantarisin IIA-1A5 ditempatkan di dalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya dibekukan dalam *freezer* -20°C, setelah dibekukan, kemudian dimasukkan ke dalam alat *freeze drier* (Buchi, Lyovapor L-200) yang sudah diatur pada suhu -55°C dengan tekanan 0,1 mbar selama 36 jam.

Uji Antimikroba Plantarisin IIA-1A5

Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan *Escherichia coli* Enteroksigenik ATCC 25922 dipilih sebagai wakil bakteri patogen Gram positif dan Gram negatif. Bakteri patogen diremajakan sebanyak 2 kali. Kultur selanjutnya diinokulasi dalam media NaCl 0,85% sehingga konsentrasinya menjadi 10⁸ CFU/ml (dibandingkan dengan larutan standar Mc. Farland). Pengenceran yang sama kembali dilakukan sehingga diperoleh konsentrasi bakteri 10⁶ CFU/ml. Media MHA (*Muller Hinton agar*) sebanyak 20 ml dituang ke dalam cawan petri steril. Sebanyak 100 µl bakteri patogen disebarkan pada permukaan media MHA yang telah mengeras di dalam cawan petri. *Paper disc* steril diletakkan di atas permukaan media MHA yang telah diinokulasikan bakteri patogen dan plantarisin IIA-1A5 diteteskan pada *paper disc* steril sebanyak 50 µl. Cawan tersebut selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antimikroba plantarisin ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc* dan diukur diameternya (Lash *et al.*, 2005).



Gambar 1. Profil elusi plantarisin IIA-1A5 spektrofotometer (280nm).

Aktivitas Total Bakteriosin

Aktivitas bakteriosin terhadap bakteri indikator ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling sumur agar. Unit aktivitas bakteriosin dapat dinyatakan dalam *Arbitrary Unit* per ml (AU ml). Satu AU ml merupakan luas zona hambat per satuan volume sampel bakteriosin yang diuji (mm²/ml). Aktivitas bakteriosin adalah luas zona bening (mm²) dikurangi luas cakram (mm²) dibagi dengan volume sampel (ml). Perhitungan total protein dilakukan sesuai dengan peneliti sebelumnya (Arief *et al.*, 2013) dengan dasar perhitungan hasil kali volume sampel (ml) dengan konsentrasi protein yang diukur dengan metode Lowry (mg/ml). Aktivitas spesifik juga dihitung dengan menggunakan metode sebelumnya (Arief *et al.*, 2013), yaitu dengan menghitung banyaknya jumlah unit enzim

per miligram protein yang dinyatakan dalam satuan AU/mg. Aktivitas spesifik merupakan suatu ukuran kemurnian enzim atau protein spesifik yang nilainya meningkat selama pemurnian dan menjadi maksimum hingga konstan jika sudah berada pada keadaan murni. Aktivitas spesifik dihitung dengan cara membagi aktivitas total bakteriosin dengan total protein. Besar hasil produksi yang diperoleh dihitung dengan menggunakan rumus terdahulu sebagaimana disampaikan oleh peneliti terdahulu (Tiwari and Srivastava, 2008), yaitu dengan melakukan perhitungan perbandingan volume sampel setelah pemurnian dengan volume sebelum pemurnian yang dinyatakan dalam satuan persen. Uji kemurnian dilakukan berdasarkan prosedur peneliti terdahulu (Hata *et al.*, 2010), yaitu dengan cara membagi aktivitas spesifik setelah pemurnian dan sebelum pemurnian, yang dinyatakan dalam satuan kali lipat (*fold*).

Analisis Statistik

Rancangan percobaan yang dipakai adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah. Data dianalisis menggunakan analisis ANOVA satu jalur (*one-way ANOVA*). Jika nilai perbedaan $p < 0,05$, maka dilakukan uji rentang berganda Duncan (Steel and Torrie 1995).

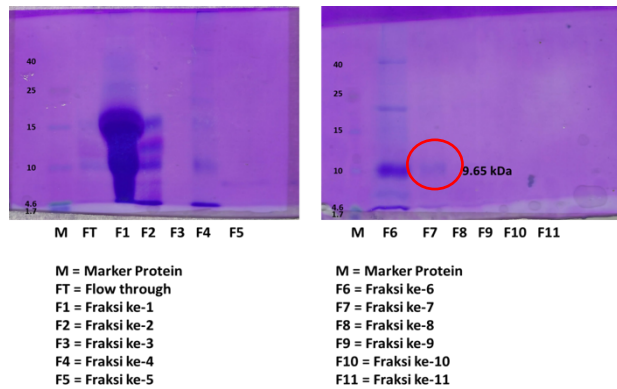
Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Plantarisin Hasil Purifikasi

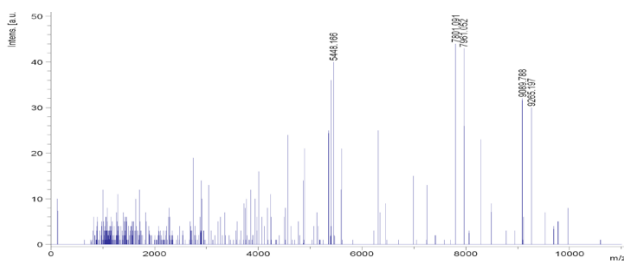
Proses pemurnian plantarisin dilakukan secara bertahap. Setelah presipitasi ammonium sulfat dan dibersihkan dengan menggunakan dialysis, maka ekstrak protein yang diperoleh dimurnikan kembali dengan menggunakan kromatografi pertukaran kation. Pemisahan protein dengan kromatografi penukar kation terjadi melalui prinsip perbedaan muatan ion pada protein, dimana plantarisin yang merupakan protein yang bermuatan positif dapat berikatan dengan sepharose selaku resin yang bermuatan negatif. Setelah berikatan kemudian dimasukkan larutan elusi dengan konsentrasi bertahap yang memiliki muatan positif kuat untuk melepaskan protein secara bertahap dari resin (Chen *et al.*, 2014). Protein plantarisin IIA-1A5 dielusikan dengan 11 fraksi. Kesebelas fraksi tersebut kemudian diukur konsentrasi proteinnya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm. Hasilnya menunjukkan bahwa setiap fraksi mempunyai konsentrasi protein yang berbeda yang ditandai dengan tingginya nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm (Gambar 1). Namun demikian, dari kesebelas fraksi tersebut belum dapat ditentukan fraksi mana yang merupakan protein plantarisin. Langkah selanjutnya adalah melakukan pengecekan bobot molekul protein dengan menggunakan *electrophoresis* SDS-PAGE.

Berdasarkan hasil elektroforesis SDS PAGE, fraksi yang hanya mempunyai satu pita adalah fraksi F7 (Gambar 2). Fraksi ini terpilih merupakan fraksi yang mengandung plantarisin IIA-1A5, karena berdasarkan hasil penelitian dari Fatmarani *et al.*, (2018) yang juga melakukan penelitian produksi plantarisin dari whey keju

diperoleh berat molekul ekstrak plantarisin kasar adalah sekitar 9,5 kDa. Pada penelitian ini fraksi 7 yang merupakan fraksi aktif dari plantarisin yang berhasil dipurifikasi dengan menggunakan kromatografi pertukaran kation mempunyai berat molekul protein sebesar 9,65 kDa. Hasil ini dikonfirmasi setelah pewarnaan dengan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil SDS-Page masing-masing fraksi.



Gambar 3 Hasil MALDI TOF MS plantarisin IIA-1A5.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan terdahulu, diantaranya plantarisin LR yang mempunyai berat molekul sebesar 6,2 kDa (Tiwari and Srivastava, 2008) juga Arief *et al.* (2015) yang mempurifikasi plantarisin IIA-1A5 dari media pertumbuhan *de Man Rogosa Sharp-broth* dan diperoleh hasil bahwa plantarisin tersebut berukuran 6,5 kDa. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan strain bakteri dan media pertumbuhan mampu menghasilkan plantarisin dengan berat molekul yang berbeda. Berdasarkan berat molekulnya yaitu 9,65 kDa (< 10 kDa), maka plantarisin IIA-1A5 yang diproduksi dari media pertumbuhan whey keju termasuk golongan bakteriosin kelas 2 (Diep *et al.*, 2009).

Konfirmasi Berat Molekul Plantarisin

Hasil MALDI TOF plantarisin IIA-1A5 menunjukkan pola peptida yang unik dan menarik dari plantarisin (Gambar 3). Jika digambarkan dengan SDS-Page hanya 1 band tunggal yaitu 9,65 kDa, setelah diidentifikasi berat molekul peptidanya, ternyata ada 5 peptida yaitu berukuran 5,5, 7,80, 7,96, 9,09 kDa, dan peptida terakhir berukuran 9,27 kDa. Ada 2 kemungkinan karakteristik protein yang baru dari plantarisin IIA-1A5 yaitu sebagai berikut (1) ada kemungkinan proses purifikasi belum menghasilkan plantarisin yang sangat murni, sehingga masih

bercampur dengan peptida lainnya. Jika dibandingkan dengan hasil Arief *et al.* (2015) berat molekul plantarisin IIA-1A5 dengan media MRS broth adalah 6,5 kDa, sedangkan hasil penelitian ini adalah 9,65 kDa dan setelah diidentifikasi dengan MALDI TOF ternyata terdiri dari kelima peptida dengan ukuran yang berbeda, ada yang mendekati 6 kDa (5,5 kDa) dan ada yang mendekati 9,65 kDa (9,09 kDa dan 9,27 kDa) dan (2) kelima peptida tersebut melakukan aktivitas yang sinergis untuk antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli* sehingga kemungkinan kedua adalah Plantarisin IIA-1A5 merupakan kumpulan peptida, yaitu peptida dengan ukuran berat molekul 5,5, 7,80, 7,96, 9,09, dan 9,27 kDa.

Analisis kemungkinan kedua lebih sesuai jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu. Holo *et al.* (2001) melaporkan bahwa plantarisin W memiliki dua peptida. Tiwari and Srivastava (2008) juga melaporkan bahwa plantarisin LR14 yang diproduksi oleh *L. plantarum* LR/14 mempunyai dua peptida yaitu LR14 α and LR14 β . Peneliti lain menegaskan yaitu Diep *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa Plantarisin EF and JK termasuk dalam bakteriosin kelas IIb yang memiliki 2 peptida dengan aktivitas yang tergantung pada dua peptida lainnya, dengan kata lain mempunyai empat peptida yang saling mempengaruhi kinerja antimikrobanya.

Karakteristik Plantarisin IIA-1A5

Tingkat kemurnian dan aktivitas spesifik plantarisin IIA-1A5 yang telah mengalami purifikasi secara bertahap mulai dari supernatant bebas sel dengan pH 6,8 (netral), presipitasi ammonium sulfat, kromatografi penukar kation, pengeringan beku ditunjukkan pada Tabel 1. Purifikasi bertahap mulai dari presipitasi ammonium sulfat belum berhasil meningkatkan kemurnian ekstrak plantarisin kasar yang ditandai hanya 0,85 dari kandungan plantarisin di supernatant bebas sel. Purifikasi dengan kromatografi pertukaran kation mampu meningkatkan tingkat kemurnian menjadi 2,66 dengan konsentrasi protein yang meningkat dan tingkat aktivitas spesifik plantarisin menjadi 20.205,32 AU/mg yaitu 3 kali lipat lebih besar dari sebelumnya hanya 7.604,11 AU/mg pada supernatant bebas sel. Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Tiwari and Srivastava (2008) yang melaporkan aktivitas spesifik plantarisin LR14 sebesar 304 AU/mg, dengan tingkat kemurnian 5,6 kali lipat dari supernatant dan memberikan yield sebesar 3%, hasil penelitian ini lebih besar karena aktivitas spesifik plantarisin IIA-1A5 adalah 47.025,07 AU/mg. Demikian juga hasil penelitian ini lebih besar jika dibandingkan dengan plantarisin ZJ5 yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 1.224,18 AU/mg, dengan tingkat kemurnian 16,15 kali lipat dari supernatant dan memberikan *yield* sebesar 7,5% (Song *et al.* 2014).

Proses selanjutnya adalah pemekatan hasil purifikasi dengan menggunakan pengeringan beku. Kristal plantarisin kering beku mampu ditingkatkan kepekatannya menjadi 6,18 kali lebih besar

Tabel 1. Nilai aktivitas spesifik dan kadar protein plantarisin IIA-1A5 hasil pemurnian dan pemekatan.

Tahap purifikasi dan pemekatan dengan <i>freeze drying</i>	Volume (ml)	Konsentrasi protein ($\mu\text{g/ml}$)	Total protein (mg)	Aktivitas total (AU)	Aktivitas spesifik (AU/mg)	Hasil (%)	Tingkat kemurnian
Supernatan bebas sel	1.000	24.331	24,331	185.016,65	7.604,11	100	1
Presipitasi	236	57.181	13,483	87.574,86	6.495,02	47,33	0,85
Kromatografi	100	24.093	2,409	48.680,48	20.205,32	26,31	2,66
Plantarisin kering beku	20	24.948	0,499	23.463,20	47.025,07	12,68	6,18

Tabel 2. Diameter zona hambat (mm) dari plantarisin IIA-1A5 cair, plantarisin IIA-1A5 kering beku, antibiotik dan nisin terhadap bakteri *S. aureus* dan *E.coli*.

Perlakuan	Konsentrasi protein ($\mu\text{g/ ml}$)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)
Plantarisin cair IIA-1A5	24,09 \pm 1,98 ^b	7,80 \pm 0,17 ^d	7,41 \pm 0,52 ^d
Plantarisin kering beku IIA-1A5	22,34 \pm 4,03 ^b	22,49 \pm 0,47 ^b	21,24 \pm 0,40 ^a
Nisin	32,21 \pm 3,14 ^a	11,15 \pm 0,41 ^c	11,26 \pm 0,62 ^c
Ampisilin	10,00 \pm 0,00 ^c	25,18 \pm 0,11 ^a	12,89 \pm 0,69 ^b
Penisilin	10,00 \pm 0,00 ^c	23,02 \pm 0,03 ^b	13,47 \pm 0,76 ^b

Angka-angka pada kolom yang sama dan diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

dibandingkan dengan supernatant bebas sel, dengan nilai aktivitas spesifik menjadi lebih tinggi yaitu 47.025,07 AU/mg. Hal ini membuktikan bahwa pengeringan beku berhasil menjadikan satu produk baru dari cair menjadi kristal plantarisin. Enkapsulasi plantarisin dengan menggunakan bahan enkapsulat maltodekstrin berhasil dilakukan pada penelitian ini.

Enkapsulasi adalah proses memerangkap satu senyawa dengan senyawa lainnya untuk menghasilkan partikel yang kecil (Jenie, 2018). Enkapsulasi bakteriosin dari bakteri asam laktat bertujuan untuk melindungi dari kondisi lingkungan yang tidak disukai dan ketidakcocokan. Beberapa metode untuk enkapsulasi bakteriosin adalah *film coating*, liposomes, nanofibers dan nanopartikel. Metode enkapsulasi ini digunakan secara *frequently* untuk melindungi makanan dan bidang farmasi. Keuntungan dasar penggunaan nanoenkapsulasi bakteriosin menggunakan nanomaterial dikarenakan kebutuhan untuk meningkatkan farmakokinetik dengan mengubah karakteristik fisik seperti kelarutan, half-life dan ketersediaan hayati (Okuro *et al.*, 2013).

Polimer yang biasa digunakan untuk proses enkapsulasi khususnya untuk bakteri adalah polisakarida diantaranya karagenan, alginate, xanthan, gum arab, kasein, whey (Simha *et al.*, 2012; Levin *et al.*, 2016) serta maltodekstrin (Fatmarani *et al.*, 2018). Pengkapsul maltodextrin mampu melindungi protein selama proses *freeze dry* dan cepat kering. Maltodekstrin bersifat mudah larut dalam cairan, dan sifat bahan yang mudah mengering sehingga menjadikan mudah kering dalam proses pengeringan untuk menjadi serbuk (Triyono, 2010). Pada penelitian ini, pengeringan beku plantarisin 1A5 berhasil dilakukan dengan menggunakan bahan enkapsulasi maltodekstrin. Bentuk kristal dari plantarisin IIA-1A5 kering beku ditunjukkan pada Gambar 4.

Aktivitas Antimikroba Plantarisin IIA-1A5

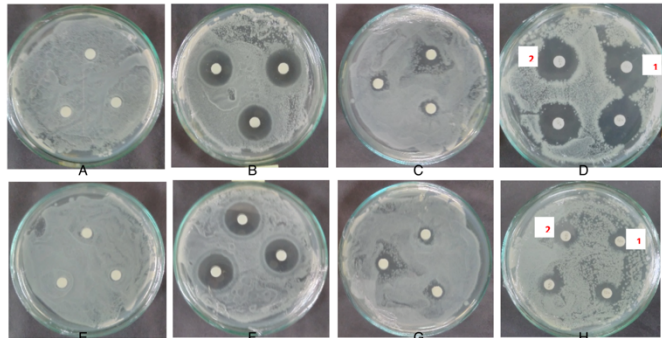
Kemampuan antimikroba plantarisin kering beku terhadap bakteri patogen *S. aureus* jauh meningkat

dibandingkan dengan plantarisin cair (3 kali lipat), dan lebih besar daripada aktivitas antimikroba nisin, namun masih di bawah antibiotik ampisilin dan penisilin ($p < 0,05$), seperti ditunjukkan pada Tabel 2. Namun hal yang menarik adalah aktivitas antimikroba Plantarisin IIA-1A5 terhadap bakteri Gram negatif yaitu *E. coli*. Aktivitas antimikroba Plantarisin IIA-1A5 terhadap *E. coli* paling tinggi jika dibandingkan dengan plantarisin cair, nisin, antibiotik ampisilin dan penisilin ($p < 0,05$) (Tabel 2). Hal ini disebabkan bahwa ada bahan tambahan untuk mengencerkan plantarisin kering beku yaitu EDTA, dimana EDTA bersifat aditif terhadap aktivitas antimikroba melawan *E.coli*. EDTA kemungkinan mampu berperan terlebih dahulu mengganggu stabilitas membrane sel, lalu diteruskan oleh plantarisin yang melakukan aksi antimikrobanya. Konsentrasi protein untuk plantarisin cair dan kering setara, namun nisin lebih tinggi daripada plantarisin IIA-1A5. Konsentrasi ampisilin dan amoxillin yang digunakan lebih rendah dibandingkan plantarisin dan nisin. Hal yang menarik selanjutnya adalah, bahwa konsentrasi protein nisin yang dibutuhkan untuk uji aktivitas antimiroba lebih tinggi dibandingkan dengan plantarisin IIA-1A5 yang cair maupun kering beku, namun aktivitas antimikroba nisin lebih rendah terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Dengan demikian plantarisin IIA-1A5 lebih efektif dan ekonomis dibandingkan dengan nisin komersial. Ini merupakan temuan baru dari penelitian ini.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat dinyatakan bahwa Plantarisin IIA-1A5 mempunyai kemampuan antimikroba dengan spektrum luas terhadap bakteri indikator patogen Gram positif dan Gram negatif (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa plantarisin IIA-1A5 bekerja efektif melawan bakteri patogen penyebab kerusakan dan keracunan makanan. Berdasarkan Gillor *et al.* (2008), pola aksi bakteriosin secara umum adalah mematikan bakteri melalui pembentukan pori pori pada membran sel yang mengakibatkan sel bocor dan akhirnya mati. Hal ini diperjelas dengan terbentuknya zona bening yang jelas di sekitar *paper disc* (Gambar 5).



Gambar 4 Kristal plantarisin IIA-1A5 kering beku.



Gambar 5. Zona bening penghambatan bakteri patogen oleh plantarisin IIA-1A5.

Keterangan: A = Plantarisin cair (*S. aureus*), B = Plantarisin freeze-dried (*S. aureus*), C = Nisin (*S. aureus*), D = Antibiotik (1 = Penisilin, 2 = Ampisilin) (*S. aureus*), E = Plantarisin cair (*E. coli*), F = Plantarisin freeze-dried (*E. coli*), G = Nisin (*E. coli*), H = Antibiotik (1 = Penisilin, 2 = Ampisilin) (*E. coli*)

Penentuan Minimum Inhibitory Concentration

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) merupakan konsentrasi terendah suatu substrat anti mikroba yang dapat membunuh sebanyak 90% atau 1 log CFU/ml bakteri indikator. Berdasarkan perhitungan seperti terlihat pada Tabel 3, pada konsentrasi 25% (konsentrasi protein sebesar 5,58 µg/ml) plantarisin IIA-1A5 belum mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* sebesar 1 log CFU/ml. Namun pada konsentrasi 50% (konsentrasi protein 11,17 µg/ml) pertumbuhan *S. aureus* turun 3 angka log CFU/ml; sedangkan *E. coli* turun populasinya sebesar 2 log CFU/ml. Melalui perhitungan matematika, didapatkan MIC plantarisin IIA-1A5 adalah pada konsentrasi protein 7,43 µg/ml.

Tabel 3 Perhitungan nilai MIC plantarisin IIA-1A5.

Persentase protein	Konsentrasi protein (µg/ml)	Populasi <i>S. aureus</i> (log CFU/ml)	Populasi <i>E. coli</i> (log CFU/ml)
0	0,00	8,00±0,16	8,64±0,26
25	5,58	8,12±0,00	8,71±0,00
50	11,17	5,09±0,44	6,66±1,17
75	16,75	4,13±1,49	3,77±0,35
100	22,34	4,06±0,79	3,49±0,05

Kesimpulan

Plantarisin IIA-1A5 sebagai antimikroba dengan media pertumbuhan whey ditambah susu skim, telah berhasil dimurnikan secara bertahap dan mempunyai karakteristik protein berupa pita tunggal dengan bobot molekul 9,65 kDa. Plantarisin IIA-1A5 terdiri dari lima peptida dan memiliki aktivitas antimikroba yang setara dengan antibiotik ampisillin dan penicillin terhadap

bakteri *E. coli*, dan setara dengan nisin terhadap bakteri *S. aureus*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset, teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan yang telah diberikan dalam Hibah Pasca dengan Nomor : 129/SP2H/PTNBH/DRPM/2018, serta Prof. Dr. Masahiro Ogawa dari Kagawa University Jepang yang telah memberikan ijin penggunaan alat MALDI TOF-MS dengan dana Hibah Kerjasama Luar negeri (KLN) No Kontrak : 3/EI/KP.PTNBH/2019.

Daftar Pustaka

Arief, I.I., Jenie, B.S.L., Astawan, M., Fujiyama, K., Witarto, A.B. 2015. Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian Journal Animal Science* 9(1):25-36. DOI: 10.3923/ajas.2015.25.36.

Arief, I.I, Jakaria, Suryati, T., Wulandari, Z., Andreas, E. 2013. Isolation and characterization of plantarisin produced by *Lactobacillus plantarum* strains (IIA-1A5, IIA-1B1, IIA-2B2). *Media Peternakan Journal of Animal Science and Technology* 36:91-100. DOI:10.5398/medpet.2013.36.2.91.

Arief, I.I., Budiman, C, Jenie, B.S.L., Andreas, E., Yuneni, A. 2015. Plantarisin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Beneficial Microbes* 6: 603-613. DOI: 10.3920/BM2014.0064.

Burhan, H., Priyambada, S.A., Taufik, E., Arief, I.I. 2017. Potential of lactic acid bacteria isolated from dangke and Indonesian beef as hypocholesterolaemic agent. *Jurnal Media Peternakan* 40(2):136-142. DOI: 10.5398/medpet.2017.40.2.136.

Chen, Y.S., Yan, C.W., Yiou, S.C., Fujitoshi, Y., Chen, C.L., Chi, M.C. 2014. Purification and characterization of plantarisin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. *Archive of Microbiology* 196 :193–199. DOI: 10.1007/s00203-014-0958-2.

Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., Nes, I.F. 2009. An overview of the mosaic plantarisin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30: 1562-1574. DOI:10.1016/j.peptides.2009.05.014.

Fatmarani, R., Arief, I.I., Budiman, C. 2018. Purification of Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 grown in various whey cheese media under freeze dried condition. *Tropical Animal Science Journal* 41(1):53-59. DOI:10.5398/tasj.2018.41.1.53

Ganju, S., Gogate, P.R. 2017. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering* 215:84-96. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021.

Gillespie, A.L., Calderwood, D., Hobson, L., Green, B.D. 2015. Whey proteins have beneficial effects on intestinal enteroendocrine cells stimulating cell

- growth and increasing the production and secretion of incretin hormones. *Food Chemistry* 198: 120-128. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.02.022.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., 2008. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 591-606. DOI:10.1007/s00253-008-1726-5.
- Hanifah, R., Arief, I.I., Budiman, C. 2015. Antimicrobial activity of goat milk yoghurt with addition of a probiotic *Lactobacillus acidophilus* IIA – 2B4 and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L) extract. *International Food Research Journal* 23(6):26382645.
- Hata, T., Tanaka, R., Ohmomo, S. 2010. Isolation and characterization of plantaricin asm1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ASM1. *International Journal of Food Microbiology* 137:94-99. DOI: 10.1007/s00253-008-1726-5.
- Jenie, BSL. 2018. Pangan Probiotik. Bogor (ID). IPB Press.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.M., Gourama, H. 2005. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8-14). *Food Microbiology* 22: 199-204. DOI:10.1016/j.fm.2004.03.006.
- Levin, M.A., Burrington, K.J., Hartel, R.W. 2016. Composition and functionality of whey protein phospholipid concentrate and delactosed permeate. *Journal of Dairy Science* 99: 1-11. DOI:10.3168/jds.2016-10974.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Fair, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin fenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275. PMID: 14907713.
- Nilsang, S. 2010. Bacteriocin production by lactic acid bacteria encapsulated in calcium alginate beads. *KKU Research Journal* 15 (9): 891-894.
- Okuro, P.K., Thomazini, M., Balieiro, C.C., Liberal, R.D.C.O., Fávoro-Trindade, C.S. 2013. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International* 53: 96-103. DOI :10.1016/j.foodres.2013.03.042.
- Patel, S. 2015. Functional foods relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods* 19 (Part A):308-319 DOI:10.1016/j.jff.2015.09.040.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, A., de Valdez, G.F. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 141:73–81 DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011.
- Pingitore, E.V., Elena, B., Maria, E. 2012. Effect of lyophilization and storage temperature on the activity of salivaricin CRL 1328, a potential bioactive ingredient of a urogenital probiotic product. *The Journal of General and Applied Microbiology* 58:71-81. PMID: 22688238.
- Simha, B.V., Sood, S.K., Kumariya, R., Garsa, A.K. 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research* 167(9): 544-549. DOI:10.1016/j.micres.2012.01.001.
- Soenarno, M.S., Sumantri, C., Taufik, E., Nuraida, L., Arief, I.I. 2019. *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 fermentation patterns by using whey, buttermilk and whey enriched by skimmed milk as growth media. *Pakistan Journal of Nutrition* 18(3): 288-295. DOI:10.3923/pjn.2019.288.295.
- Song, D.F., Mu, Y.Z., Qing, G. 2014. Purification and characterization of plantaricin zj5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE* 9(8):e105549. DOI:10.1371/journal.pone.0105549.
- Steel, G.R., Torrie, H.J. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Sumantri B, penerjemah. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Media.
- Tiwari, S.K., Srivastava, S. 2008. Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:759–767. DOI:10.1007/s00253-008-1482-6.
- Trang Le, T.Y., Bach, L.G., Nguen, D.C., Xuen Le, T.H., Pham, K.H., Nguyen, D.H., Hoang Thi, T.T. 2019. Evaluation of factors affecting antimicrobial activity of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* microencapsulated in alginate-gelatin capsules and its application on pork meat as a bio-preservative. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16:1017. DOI: 10.3390/ijerph16061017.
- Triyono, A. 2010. Mempelajari pengaruh maltodekstrin dan susu skim terhadap karakteristik yoghurt kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.). *Proceeding Seminar Rekayasa Kimia dan Proses, Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro, Semarang.*
- 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:article 241. DOI:10.3389/fmicb.2014.00241.