



SKRINING NOVEL PREBIOTIK *SELECTIVE FERMENTATION INITIATOR* (SFI) UNTUK BAKTERI PROBIOTIK ELEKTROGENIK KULIT

Prakoso Adi^{1*}, Rizka Mulyani¹, John Jackson Yang²

¹Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Sekolah Vokasi, Universitas Sebelas Maret

²Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Indonesia

*Corresponding author: prakoso.adi@staff.uns.ac.id

(Diterima: 12 Juli 2022; Disetujui: 31 Agustus 2022)

ABSTRACT

The ability of electrogenic bacteria to generate electricity has been widely reported. In some cases of bacteria, the electricity production comes from the bacterial fermentation process of SFI compounds by these bacteria. Later, the resulted electrons are transferred out from inside to extracellular recipient molecules. Among of these studies has shown the ability of gram-positive bacteria *S. epidermidis* ATCC 12228 in terms of SFI compounds utilization to increase bacterial electron production and its application in the medical field. Based on these studies, the discovery of new SFI compounds becomes interesting to be explored. In this study, a new SFI compound was screened from 24 different compounds. The screen was initiated by testing the ability of these compounds to increase the fermentation activity of *S. epidermidis* ATCC 12228 in a 96-well plate. Determination of SFI compound was carried out by checking the exclusivity of the compound to increase the fermentation activity of *S. epidermidis* ATCC 12228. The selected SFI compound was then tested for cytotoxicity against this bacterium and its ability to increase the electron production of *S. epidermidis* ATCC 12228 using a microbial fuel cell (MFC). This study was successfully demonstrated the non-toxic properties of p-coumaric acid, also the ability of this compound to increase the fermentation activity and electron production of *S. epidermidis* ATCC 12228. This research is expected to be the first step to find another novel SFI compounds that will be useful in certain fields in the future.

Keywords: electrogenic bacteria, novel SFI, screen, *S. epidermidis*

ABSTRAK

Kemampuan bakteri elektrogenik dalam menghasilkan listrik telah banyak dilaporkan. Pada beberapa kasus bakteri, produksi listrik tersebut bersumber dari elektron hasil proses fermentasi senyawa SFI oleh bakteri ini yang kemudian didonorkan dari bagian intraseluler ke molekul penerima ekstraseluler. Diantara penelitian tersebut telah ditunjukkan kemampuan bakteri gram positif *S. epidermidis* ATCC 12228 dalam menggunakan senyawa SFI untuk meningkatkan produksi elektron dan aplikasinya dalam bidang medis. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut, studi penemuan senyawa SFI baru menjadi menarik untuk dieksplorasi. Pada penelitian ini telah dilakukan skrining senyawa SFI baru dari 24 senyawa yang berbeda. Proses skrining diawali dengan menguji kemampuan 24 senyawa tersebut dalam meningkatkan aktivitas fermentasi bakteri *S. epidermidis* ATCC 1228 dalam 96-well plate. Penentuan suatu senyawa dikategorikan sebagai senyawa SFI dilakukan dengan mengecek eksklusivitas senyawa tersebut dalam meningkatkan aktivitas fermentasi *S. epidermidis* ATCC 12228. Senyawa SFI terpilih kemudian diuji sitotoksitasnya terhadap bakteri ini serta kemampuannya dalam meningkatkan produksi elektron *S. epidermidis* ATCC 12228 menggunakan *microbial fuel cell* (MFC) yang terhubung dengan multimeter. Proses skrining pada penelitian ini berhasil menunjukkan kemampuan senyawa SFI baru yang bernama p-coumaric acid dalam meningkatkan aktivitas fermentasi dan produksi elektron dari *S. epidermidis* ATCC 12228. Selain itu, senyawa tersebut juga tidak bersifat toksik pada bakteri ini, sehingga aman untuk diaplikasikan. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi langkah awal dalam menemukan senyawa-senyawa SFI baru yang akan bermanfaat pada bidang tertentu di masa mendatang.

Kata kunci: bakteri elektrogenik, *S. epidermidis*, SFI baru, skrining

Cite this as: Adi, P., Mulyani, R., Yang, J. J. (2022). Skrining Novel Prebiotik Selective Fermentation Initiator (SFI) Untuk Bakteri Probiotik Elektronik Kulit *JAHT: Journal of Applied Agriculture, Health, and Technology* 1(1), 1-17

PENDAHULUAN

Beberapa bakteri yang disebut sebagai bakteri elektrogenik telah dilaporkan dapat mendonorkan elektron dari bagian intraseluler ke penerima elektron ekstraseluler. Bakteri-bakteri tersebut seperti *Geobacter metallireducens* dan *Shewanella oneidensis* MR-1, dapat menggunakan beberapa senyawa untuk menghasilkan elektron yang kemudian mendonorkannya ke penerima yang berada di ekstraseluler. Bakteri tersebut mengoksidasi senyawa-senyawa organik atau hidrogen (H₂) untuk memproduksi elektron, dan mentransferkan ke penerima elektron seperti Fe(III), Mn(III) atau Mn(IV) [1]. Kemampuan bakteri-bakteri elektrogenik dalam donor elektron sering disebut sebagai *extracellular electron transfer* (EET). Bakteri elektrogenik menggunakan EET ini untuk mentransferkan elektron dari sitosol ke ruang ekstraseluler [1, 2].

Akhir-akhir ini bakteri pencernaan seperti *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, dan banyak probiotik spesies *Lactobacillus* juga dilaporkan mengekspos gen yang berhubungan dengan proses EET untuk pertumbuhan bakteri-bakteri tersebut [3-5]. Gen homolog yang berhubungan dengan EET juga ditemukan pada spesies bakteri gram positif dan negatif [4]. Bakteri gram positif memiliki jalur transfer elektron dari dalam ke bagian luar sel melalui bantuan protein yang disebut PpIA (peptide pheromone encoding lipoprotein A) yang tersusun atas dua molekul flavin [6-8]. Beberapa gen bakteri gram positif yang berhubungan dengan produksi elektron telah teridentifikasi seperti *ndh2* [9], *dmkA*,

dmkB, *MenA*, dan *HepT* [10, 11]. Elektron hasil produksi bakteri tersebut, kemudian ditransfer oleh molekul flavin dari dalam ke luar sel untuk ditangkap atau didonorkan ke penerima elektron ekstraseluler. Beberapa senyawa dan molekul penerima donor elektron juga telah diidentifikasi, diantaranya adalah hidrogen, senyawa hasil fermentasi seperti asam asetat, asam butirat dan etanol [12-14], oksigen, nitrogen dioksida, serta besi [15].

Staphylococcus epidermidis merupakan salah satu bakteri gram positif yang dapat ditemukan secara luas di kulit [16]. Kemampuan bakteri ini dalam menghasilkan elektron dan mendonorkannya ke penerima donor elektron yang berada di luar sel telah dilaporkan [17-19]. Mekanisme produksi yang memungkinkan dari bakteri ini adalah pada saat siklus asam asetat. Pada siklus ini, elektron bebas diperoleh dari reaksi reduksi NAD⁺ menjadi NADH dan FAD, FADH₂ [20]. Selain itu, produksi elektron juga dapat dihasilkan dari degradasi butirat menjadi asetat [21]. Kemampuan bakteri ini sangat menguntungkan dan berpotensi untuk dimanfaatkan dalam banyak bidang, salah satunya adalah bidang biomedis.

Kulit sebagai organ permukaan tubuh terluas sangat mudah terpapar oleh sinar UV-B. Dampak negatif yang ditimbulkan oleh UV-B ini telah banyak diteliti, diantaranya adalah stress oksidatif akibat radikal bebas yang dapat menimbulkan kerusakan kulit, inflamasi, dan bahkan kanker [22]. Oleh karenanya, Penelitian mengenai cara mengatasi dampak negatif dari radikal bebas sedang banyak dikembangkan akhir-akhir ini. Radikal bebas yang merupakan molekul labil akibat kekurangan elektron memerlukan donor elektron untuk mengubahnya ke bentuk stabil. Penelitian mengenai kemampuan elektron hasil fermentasi oleh *S. epidermidis* dalam

mencegah kerusakan kulit akibat UV-B telah didemonstrasikan melalui percobaan menggunakan tikus *international cancer research* ICR [18]. Pada penelitian tersebut menggunakan suatu senyawa yang disebut *selective fermentation initiator* (SFI) untuk menginduksi dan bahkan meningkatkan kemampuan bakteri *S. epidermidis* dalam menghasilkan elektron dan berdampak pada berkurangnya kerusakan kulit tikus ICR yang telah dipapar dengan UV-B dosis akut. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan skrining senyawa SFI baru yang berpotensi untuk mengatasi dampak negatif UV-B dan nantinya akan dapat diaplikasikan pada bidang medis serta kosmetika.

METODE

a. Persiapan Kultur Bakteri Dan Fermentasi

Kultur bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dan *Propionibacterium acne* ATCC 6919. Bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) ditumbuhkan dalam media *tryptic soy broth* (TSB) (Sigma, St. Louis, MO. USA) semalaman pada suhu 37°C . Bakteri *P.acne* ATCC 6919 (1×10^7 CFU/ml) ditumbuhkan pada *rich media* (RCM) yang mengandung 1,5 gram g/l KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany), 10 g/l yeast extract (Biokar Diagnostic, Beauvais, France), 2,5 g/l K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Germany), 3 g/l TSB, dan 0,002% (b/v) indikator phenol red (Merck, Darmstadt, Germany) selama 2-3 hari pada suhu 37°C . Bakteri *S. epidermidis* sebanyak 1×10^7 CFU/ml disiapkan untuk uji *minimum bactericidal concentration* (MBC). Sedangkan untuk keperluan uji

in vitro electricity, bakteri *S. epidermidis* disiapkan pada konsentrasi 1×10^5 dan 1×10^7 CFU/ml.

b. Uji Skrining Selective Fermentation Initiator (SFI)

2% (v/v) dari semua SFI digunakan pada uji ini. 100 μl RCM dengan penambahan indikator *phenol red* dan 10 μl bakteri uji disiapkan dalam 96-well *microplate*. Senyawa-senyawa SFI sebanyak 4 μl diteteskan pada permukaan media dan bakteri uji. Kontrol positif yang digunakan pada uji ini adalah bakteri yang diinkubasi pada media dengan penambahan 2% gliserol, sedangkan RCM tanpa bakteri dan RCM dengan bakteri tanpa penambahan SFI disiapkan sebagai kontrol negatif. Kedua bakteri tersebut disiapkan pada konsentrasi 1×10^7 CFU/ml. Fermentasi bakteri yang terjadi di amati dari perubahan warna indikator *phenol red* yang telah ditambahkan pada media RCM. Perubahan warna media dari merah menjadi kuning mengindikasikan terjadinya fermentasi bakteri. Pemilihan senyawa SFI terbaik didasarkan pada pengamatan secara kualitatif pada perubahan warna yang terjadi setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam. Sampel yang secara kualitatif memiliki warna lebih kuning, dipilih sebagai sampel terbaik. Beberapa sampel terpilih kemudian di uji secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri dengan Panjang gelombang 562 nm. Sampel SFI dengan nilai *Optical Density* (OD_{562}) terendah dipilih sebagai sampel terbaik. Adapun daftar senyawa SFI yang digunakan untuk skrining dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Daftar senyawa SFI

Nama SFI	Kode
Gliserol	G
PETIS	PE
ININ	IN
PDS	PD
p-coumaric acid	S1
Pal-KTTPS	S2
Niacinamide	S3
Golden yeast peptides	S5
Panthenol	S8
Carob seed extract	S9
White tea exact	S10
Oxygenskin	S11
D-Ribose	S12
Saffron extract	S13
Ginseng extract	S14
Sepiwhite	S17
Pal-KT	S18
Butylene Glycol	S19
Glycerin	S20
Trehalose	S21
Xylitol	S22
Sodium Hyaluronate	S23
Xanthan gum	S24
Maki	S27

c. Uji *ferric iron reductase*

S. epidermidis ATCC 12228 1×10^7 CFU/ml dipipetkan di atas permukaan media agar yang tersusun atas *rich medium*, (10 ml) [10 g/l yeast extract (Biokar Diagnostics, Beauvais, France), 5 g/l TSB, 2.5 g/l K_2HPO_4 , and 1.5 g/l KH_2PO_4] yang ditambah dengan gliserol (20g/l) dan 0,1 mg/ml *ferric ammonium citrate*. Cawan petri dipindahkan dari inkubator setelah 24 jam pada suhu 37°C dan dilanjutkan 10 ml uji overlay tambahan dengan menggunakan 0,8% agarose dan 2 mM ferrozine. Perubahan warna yang terjadi

terkait interaksi ferrozine dan Fe^{2+} diamati secara visual.

d. Uji *Elektrisitas in vitro*

Aktivitas elektrisitas bakteri dideteksi dengan menggunakan *chamber* fermentasi yang telah dilengkapi dengan katoda dan anoda. *Filth* karbon (2,5 cm x 10 cm). (Homy Tech, Taoyuan, Taiwan) dan *cloth* karbon (10 cm x 10 cm) (Homy Tech) secara berurutan digunakan untuk fabrikasi anoda dan katoda. Katoda yang telah dibungkus menggunakan membrane Nafion N117 (6 cm x 6 cm) (Homy Tech, Taipei, Taiwan) digunakan sebagai *proton exchange*

membrane (PEM) atau membrane pertukaran proton. Kabel tembaga digunakan untuk menghubungkan anoda dan katoda dengan hambatan luar (1000 Ω). *S. epidermidis* (1×10^7 CFU/ml) dalam media RCM dengan atau tanpa 2% SFI terbaik hasil skrining dipipetkan pada permukaan anoda. Aktivitas elektrolitik bakteri dicatat dengan melihat perubahan voltase (mV) terhadap waktu menggunakan multimeter digital (Lutron, DM-9962SD, Sydney, Australia). Pengukuran voltase dilakukan selama 20 menit. Voltase yang tercatat setiap 10 detik kemudian diplotkan dalam grafik.

e. Uji Toksisitas Senyawa Menggunakan Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

2% SFI atau 1x Phosphate Buffer Saline (PBS) digunakan untuk inkubasi 10^7 CFU/ml *S. epidermidis* dalam 1,5 ml tube *Eppendorf* selama 12 jam pada suhu 37°C . *S. epidermidis* yang telah diinkubasi dengan 2% SFI atau 1x PBS tersebut dibuat dalam beberapa konsentrasi dengan didilusi secara serial $1:10^0 - 1:10^5$ dalam 96-well plate. 10 μl bakteri yang telah terdilusi secara serial diteteskan pada permukaan TSB agar. Penghitungan CFU dari bakteri digunakan untuk menentukan jumlah *S. epidermidis*.

f. Analisis Statistik

Software GraphPad Prism® digunakan untuk analisis *unpaired* uji t. Perbedaan signifikan ditentukan berdasarkan observasi *p*-value sebagai berikut: *P*-value of <0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***). Pengujian terpisah (minimal) digunakan untuk menampilkan rata-rata \pm *standard error* (SE).

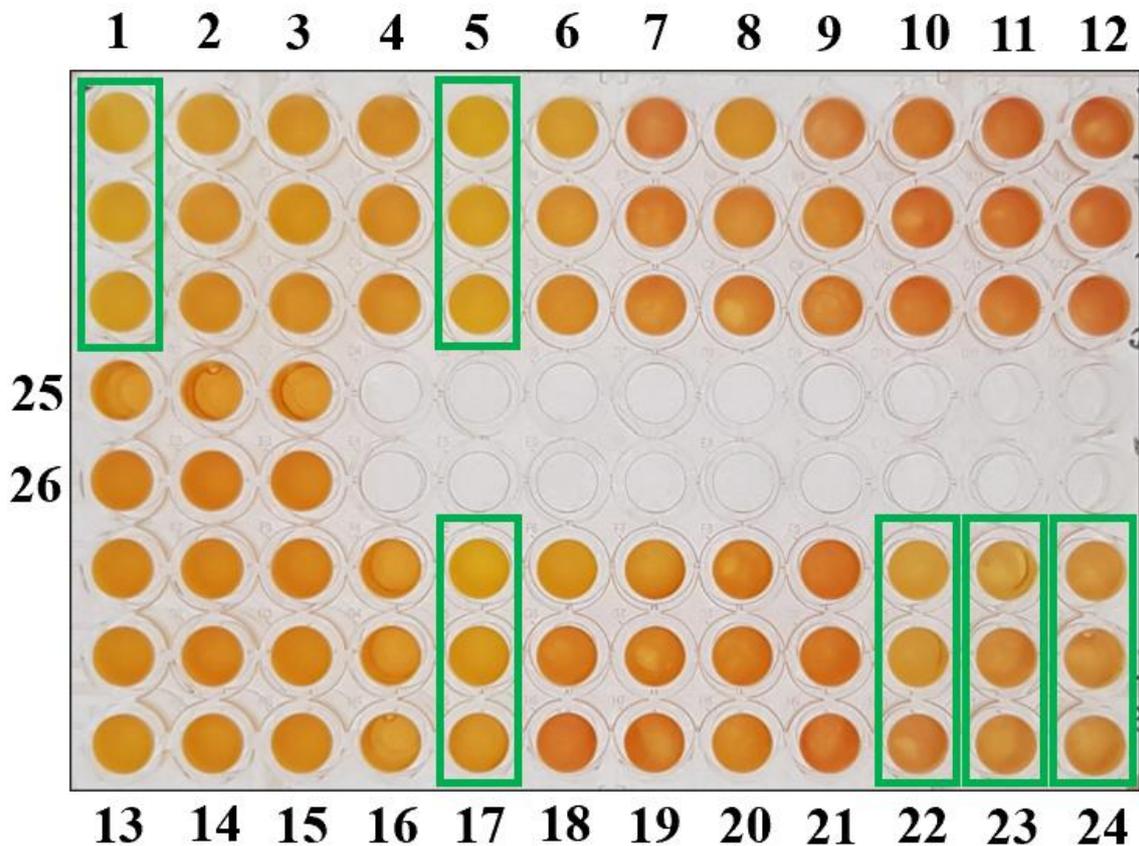
HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Skrining SFI Berdasarkan Aktivitas Fermentasi Dan Produksi Elektron Oleh Bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228

Penelitian - penelitian pendahulu telah banyak mendemonstrasikan kemampuan bakteri *S. epidermidis* dalam melakukan aktivitas fermentasi [17-19, 23]. Terutama bakteri non-biofilm dan non-infeksi strain Food and Drug Association (FDA) *S. epidermidis* ATCC 12228, menunjukkan aktivitas sebagai bakteri probiotik yang dapat memberikan efek baik pada tubuh khususnya kulit [24, 25]. Selain itu bakteri strain ini dilaporkan dapat menggunakan senyawa spesifik disebut *selective fermentation initiator* (SFI) untuk meningkatkan kemampuan fermentasinya [25] dan lebih lanjut dapat memberikan memberikan efek baik pada kulit dengan melawan efek buruk yang ditimbulkan UV-B [26]. Hal ini menjadikan penemuan senyawa prebiotik SFI terutama untuk produk kosmetika sedang banyak menarik peneliti di dunia. Pada penelitian ini telah dilakukan skrining terhadap 24 senyawa yang diduga dapat digunakan sebagai senyawa SFI yang dapat meningkatkan kemampuan fermentasi dari bakteri probiotik *S. epidermidis* ATCC 12228. Skrining dilakukan dengan cara mengamati aktivitas fermentasi ketika tanpa dan dengan penggunaan 24 senyawa tersebut. Pemilihan senyawa SFI diawali dengan melakukan uji kualitatif menggunakan media RCM dengan penambahan indikator *phenol red*. Aktivitas fermentasi bakteri akan menghasilkan senyawa metabolit bersifat asam yang akan menurunkan pH dari media yang kemudian akan mengakibatkan perubahan warna media dari merah

menjadi kuning. Studi telah melaporkan bahwa senyawa metabolit hasil fermentasi oleh bakteri ini yang asam butirat memiliki kemampuan dalam mencegah efek buruk dari sinar ultraviolet dari matahari terhadap kulit dengan cara menurunkan sitokin pro-inflamasi IL-6 melalui reseptor asam lemak rantai pendek [26]. Oleh karena itu, semakin kuning warna media RCM setelah adanya fermentasi dari *S. epidermidis* ATCC 12228 menandakan bahwa semakin banyak metabolit yang dihasilkan dan semakin baik hasil ujiannya. Pencegahan kerusakan sel kulit oleh hasil fermentasi oleh *S.*

epidermidis ATCC 12228 akibat UV-B juga telah diujikan pada tikus ICR. Efek perlindungan ini muncul dikarenakan adanya donor elektron dari hasil proses fermentasi yang dilakukan oleh *S. epidermidis* ATCC 12228 untuk menetralkan *reactive oxygen species* (ROS) yang bersifat radikal bebas [18]. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa UV-B dari sinar matahari akan memicu proses inflamasi kulit akibat produksi Fe^{3+} berlebih yang bersifat labil dan melalui donor elektron hasil fermentasi akan merubah Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang bersifat stabil.



Gambar 1. Fermentasi 24 macam senyawa SFI oleh *S. epidermidis*. *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) diinkubasi dengan penambahan 2% 24 senyawa terduga SFI yang berbeda selama 24 jam. Kontrol negatif berupa media RCM tanpa penambahan bakteri dan SFI. Sedangkan kontrol positif berupa media RCM dengan penambahan *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) dengan dan tanpa penambahan 2% gliserol. Prevalensi fermentasi diindikasikan oleh perubahan warna

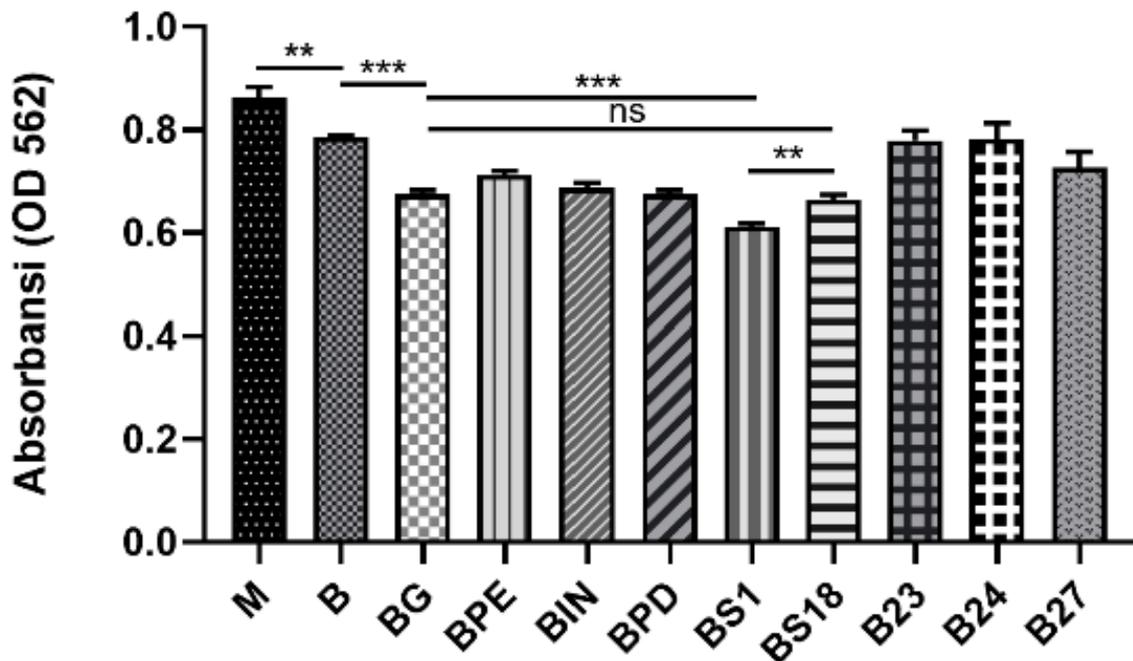
phenol red dari merah menjadi kuning. Penentuan terduga SFI terpilih dilakukan secara kualitatif dengan melihat tingkat kekuningan media RCM setelah fermentasi.

Tabel 2. Keterangan kode sampel pada Gambar 1 dengan menggunakan *S. epidermidis* ATCC 12228

No	Keterangan
1	Bakteri + G
2	Bakteri + PE
3	Bakteri + IN
4	Bakteri + PD
5	Bakteri + S1
6	Bakteri + S2
7	Bakteri + S3
8	Bakteri + S5
9	Bakteri + S8
10	Bakteri + S9
11	Bakteri + S10
12	Bakteri + S11
13	Bakteri + S12
14	Bakteri + S13
15	Bakteri + S14
16	Bakteri + S17
17	Bakteri + S18
18	Bakteri + S19
19	Bakteri + S20
20	Bakteri + S21
21	Bakteri + S22
22	Bakteri + S23
23	Bakteri + S24
24	Bakteri + S27
25	Hanya media RCM
26	Media RCM + Bakteri

Dari hasil pengamatan warna media RCM secara kualitatif setelah proses fermentasi oleh *S. epidermidis* ATCC 12228 terhadap 24 macam terduga SFI, diperoleh informasi bahwa terdapat 8 senyawa teratas yang memiliki warna lebih kuning dari pada senyawa lainnya. Kelima senyawa yang dimaksud adalah

PETIS, ININ, PDS, p-coumaric acid, Pal-KT, Sodium Hyaluronate, Xanthan Gum, dan Maki. Pengujian kemudian dilanjutkan dengan uji kuantitatif yaitu spektrofotometri dengan pengukuran absorbansi kelima terduga SFI pada panjang gelombang 562 nm (OD_{562}).



M : Media RCM broth
 B : *S. epidermidis* ATCC 12228
 G : 2% gliserol

Gambar 2. Pengukuran absorbansi fermentasi SFI oleh *S. epidermidis*. *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) diinkubasi dalam media RCM selama 24 jam dengan penambahan 2% PETIS, ININ, PDS, p-coumaric acid, Sodium Hyaluronate, Xanthan Gum, dan Maki. Data merupakan nilai rata-rata \pm SD dari 3 pengulangan uji. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,05$; ns tidak signifikan (t-test two tailed).

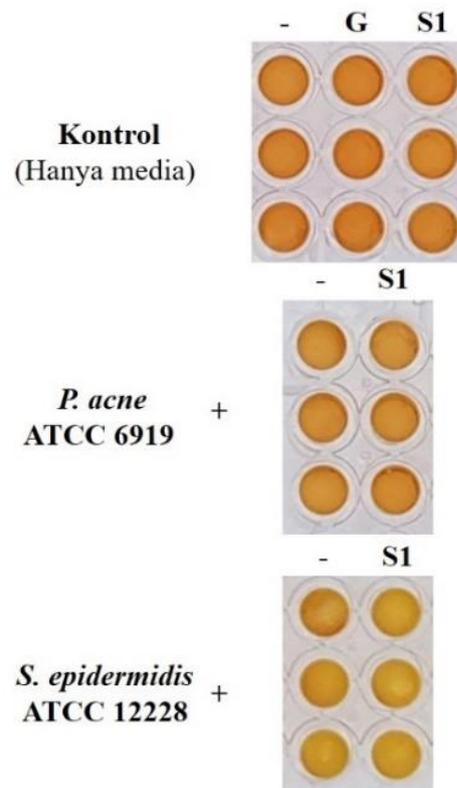
Sejalan dengan hasil pengamatan secara kualitatif, diperoleh trend data spektrofotometri yang serupa pada hasil fermentasi terduga 8 SFI terpilih oleh *S. epidermidis* ATCC 12228. Data absorbansi dengan nilai OD₅₆₂ terendah didapat dari sampel p-coumaric acid jika dibandingkan dengan kontrol positif yang berupa senyawa gliserol. Nilai absorbansi (OD₅₆₂) dari hasil fermentasi secara berurutan dari yang terendah hingga tertinggi setelah p-coumaric acid adalah Pal-KT, PDS, ININ, PETIS, MAKI, sodium hyaluronate, Xantan Gum. Dari hasil uji

statistik tersebut, sampel p-coumaric acid memiliki absorbansi yang lebih rendah dari kontrol positif yang berupa gliserol. Hal ini menandakan bahwa fermentasi *S. epidermidis* ATCC 12228 menggunakan 2% p-coumaric acid menghasilkan senyawa metabolit bersifat asam yang lebih banyak jika dibandingkan dengan penggunaan 2% gliserol. Sehingga berdasarkan hasil aktivitas fermentasi, senyawa p-coumaric acid terpilih sebagai terduga SFI terbaik dari 24 senyawa yang diujikan.

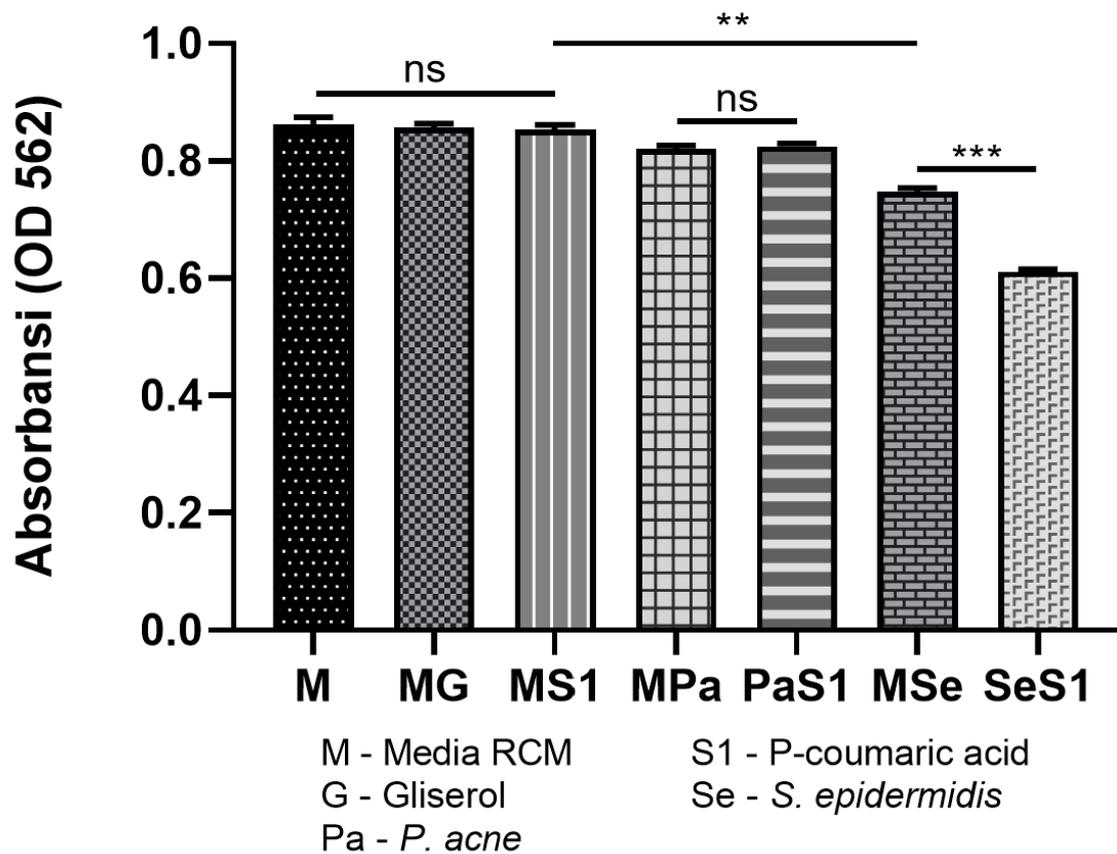
Selective Fermentation Initiator (SFI) merupakan senyawa yang dapat meningkatkan kemampuan fermentasi

dari bakteri spesifik. Spesifitas dari SFI ini mengakibatkan senyawa ini hanya dapat digunakan oleh bakteri tertentu untuk proses fermentasinya dan tidak akan mengakibatkan kemampuan fermentasi bila diaplikasikan kepada bakteri lainnya. Poly (ethylene glycol) dimethacrylate (PEG-DMA) dilaporkan memiliki kemampuan dalam meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek secara eksklusif pada *S. epidermidis* kulit [27] melalui

jalur fementasi. Namun ketika PEG-DMA ini di aplikasikan ke *S. aureus* USA300, efek peningkatan aktivitas fermentasi ini tidak terjadi [27]. Hal ini mengindikasikan bahwa suatu senyawa dapat dikatakan sebagai SFI apabila senyawa tersebut dapat meningkatkan kemampuan fermentasi bakteri tertentu dan tidak untuk bakteri lainnya. Oleh karena itu, terduga senyawa SFI p-coumaric acid juga diujikan ke bakteri kulit lainnya yaitu bakteri p-acne.



Gambar 3. Fermentasi *S. epidermidis* ATCC 12228 dan *P. acne* ATCC 6919 dengan dan tanpa p. coumaric acid (S1). *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) dan *P. acne* ATCC 6919 (1×10^7 CFU/ml) diinkubasi pada media RCM tanpa dan dengan penambahan 2% p-coumaric acid (S1) selama 24 jam.



Gambar 4. Pengukuran absorbansi fermentasi 2% p-coumaric acid *S. epidermidis* dan *P. acne*. *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) dan *P. acne* (1×10^7 CFU/ml) diinkubasi dengan dan tanpa penambahan 2% p-coumaric acid. Data merupakan nilai rata-rata \pm SD dari 3 pengulangan uji. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,05$; ns tidak signifikan (t-test two tailed).

Pengujian kualitatif penambahan p-coumaric acid pada fermentasi dua bakteri yang berbeda dapat terlihat pada Gambar 3 dan Gambar 4. Setelah 24 jam fermentasi, p-coumaric acid secara kualitatif dan kuantitatif nampak tidak meningkatkan aktivitas fermentasi pada *P. acne* ATCC 6919 tetapi secara eksklusif meningkatkan aktivitas fermentasi pada *S. epidermidis* ATCC 12228. Perubahan warna media RCM menjadi berwarna lebih kuning dan nilai absorbansi (OD_{562}) yang lebih rendah pada sumuran *S. epidermidis* ATCC 12228 yang telah ditambahkan 2% p-

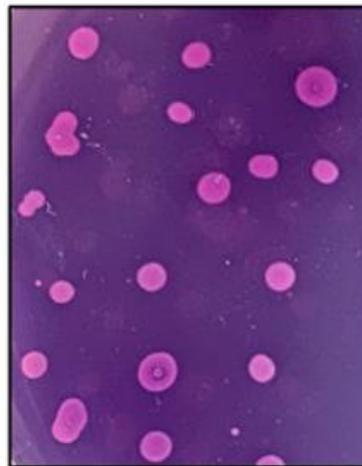
coumaric acid ke dalamnya, menandakan bahwa p-coumaric acid dapat meningkatkan aktivitas fermentasi bakteri ini. Sebaliknya, warna oranye media RCM dan nilai absorbansi yang secara statistik tidak berbeda signifikan pada sumuran *P. acne* ATCC 6919 baik dengan maupun tanpa penambahan 2% p-coumaric acid mengindikasikan bahwa efek peningkatan aktivitas fermentasi tidak terjadi pada bakteri ini. Pengujian secara kualitatif dan kuantitatif ini mengindikasikan bahwa p-coumaric acid merupakan senyawa SFI untuk bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228.

b. Uji Elektrisitas *in vitro*

Beberapa studi telah melaporkan tentang kemampuan dari beberapa bakteri dalam menghasilkan arus listrik (bakteri elektrogenik) dan menyalurkannya ke penerima ekstraseluler [1, 28]. Fe^{3+} bersifat labil dan merupakan penerima elektron atau *electron acceptor*. Fe^{3+} ini dapat

berubah menjadi Fe^{2+} yang bersifat stabil ketika menerima satu elektron bebas (e^-) melalui reaksi redoks. Karakteristik ini dapat digunakan membuktikan kemampuan dari bakteri terkait kemampuannya dalam menghasilkan arus listrik.

S. epidermidis **(ATCC12228)**



Gambar 5. *Ferric ammonium citrate* ditambahkan ke dalam media RCM dengan penambahan gliserol sebagai lapisan pertama dan agarose dengan penambahan ferrozine diletakkan di atas lapisan pertama. Perubahan warna menjadi merah muda pada koloni *S. epidermidis* ATCC 12228 mengindikasikan terjadinya perubahan Fe^{3+} menjadi Fe^{2+}

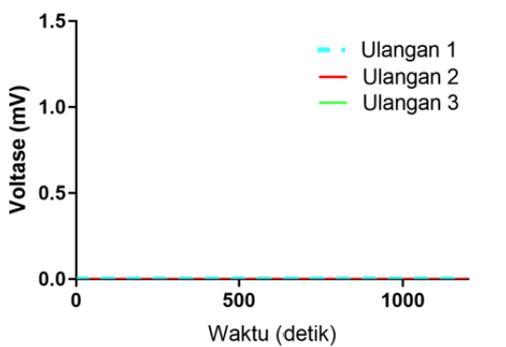
Pada uji *ferric iron reductase*, Fe^{3+} dalam *ferric ammonium citrate* akan diubah menjadi Fe^{2+} oleh elektron yang didonorkan dari hasil proses fermentasi bakteri. Perubahan ini diindikasikan dengan terbentuknya warna merah muda pada sekitar koloni bakteri karena adanya reaksi kelas Fe^{2+}

dan ferrozine yang ditambahkan ke dalam media. Pada Gambar 5. Telah nampak dengan jelas adanya warna merah muda disekeliling bakteri *S.*

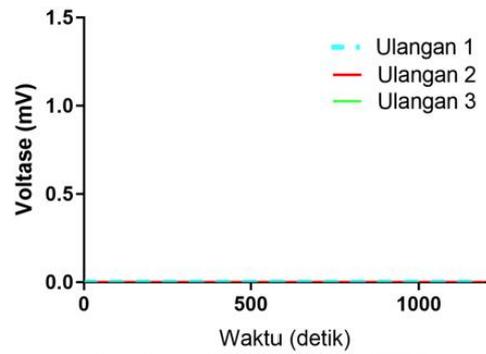
epidermidis ATCC 12228. Hal ini menunjukkan bahwa adanya elektron yang di donorkan dari hasil fermentasi bakteri ini pada Fe^{3+} dalam media, sehingga bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 yang digunakan pada penelitian ini dapat dikategorikan sebagai bakteri elektrogenik yang dapat menghasilkan electron dan mendonorkannya ke penerima elektron ekstraseluler. Kemampuan bakteri ini dalam mendonorkan elektron ke penerima elektron ekstraseluler menjadi suatu kelebihan karena memiliki potensi

untuk dimanfaatkan dalam bidang medis. Penelitian mengenai manfaat terapeutik dari elektron hasil fermentasi gliserol oleh *S. epidermidis* ATCC 12228 dalam melawan efek buruk dari UV-B telah dilaporkan [18]. Pada percobaan tersebut, kulit tikus ICR yang telah dipapar oleh UV-B kronis dan diberi hasil fermentasi *S. epidermidis* ATCC 12228 memiliki jumlah 4HNE dan CPD yang lebih

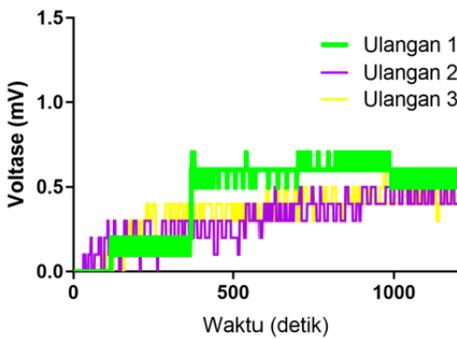
rendah daripada kulit tikus yang tanpa diberi hasil fermentasi tersebut. Hal ini mendemonstrasikan bahwa elektron yang berada pada hasil fermentasi bakteri tersebut memiliki dampak penyembuhan atau terapeutik. Efek pencegahan jerawat dari elektron hasil fermentasi *S. epidermidis* yang menggunakan SFI juga telah didemonstrasikan [19].



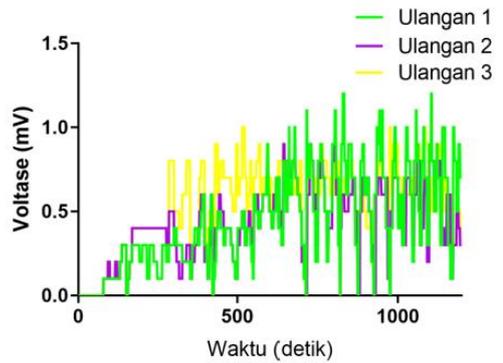
S. epidermidis ATCC 12228 (1×10^5 CFU/ml) + air



S. epidermidis ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) + air



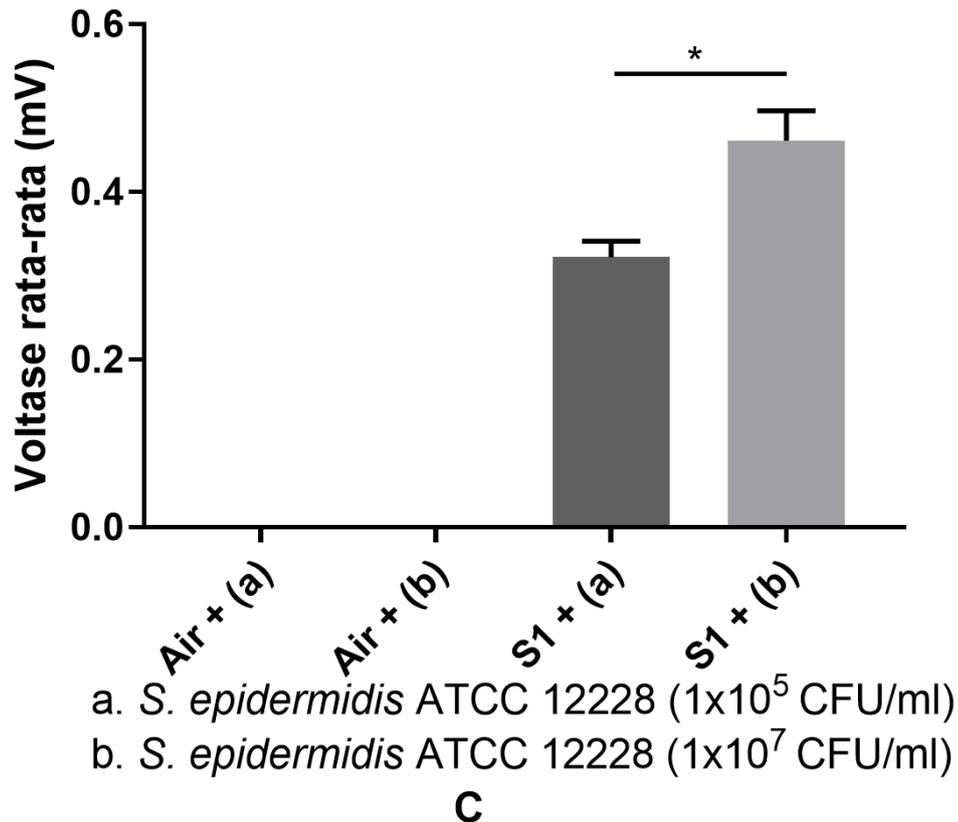
S. epidermidis ATCC 12228 (1×10^5 CFU/ml) + 2% p-coumaric acid



S. epidermidis ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) + 2% p-coumaric acid

a

b



Gambar 6. Produksi listrik oleh *S. epidermidis* ATCC 12228. Voltase listrik (mV) hasil fermentasi a) 1×10^5 dan b) 1×10^7 CFU/ml *S. epidermidis* ATCC 12228 pada media RCM dengan dan tanpa penambahan 2% p-coumaric acid tercatat oleh *microbial fuel cell* (MFC) yang terhubung dengan multimeter. c) Produksi listrik yang tercatat diolah statistik menggunakan Software GraphPad Prism® dan dinyatakan dalam voltase rata-rata (mV). Data merupakan nilai rata-rata \pm SD dari 3 pengulangan uji. * $P < 0,01$ (t-test two tailed).

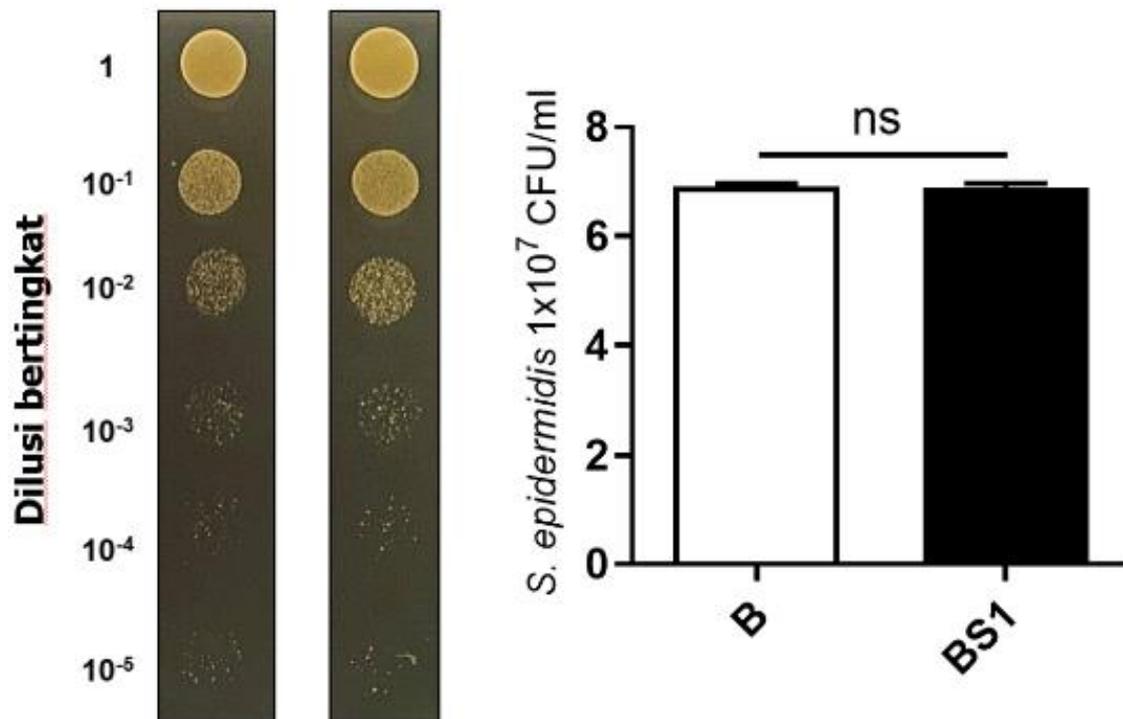
P-coumaric acid telah menunjukkan hasil positif sebagai SFI karena dapat meningkatkan aktivitas fermentasi *S. epidermidis* ATCC 12228. Peningkatan produksi listrik dari hasil fermentasi bakteri ini juga tercatat ketika p-coumaric acid ditambahkan ke dalam sistem fermentasi. Menariknya, ketika konsentrasi *S. epidermidis* ATCC 12228 ditingkatkan dari 1×10^5 CFU/ml menjadi 1×10^7 CFU/ml dengan konsentrasi penambahan p-coumaric acid yang sama, jumlah listrik yang dihasilkan juga meningkat secara signifikan. Sedangkan ketika faktor p-

coumaric acid dihilangkan dari sistem fermentasi, tidak ada voltase listrik yang terekam. Hal tersebut mengindikasikan bahwa voltase listrik yang tercatat oleh multimeter berasal dari hasil fermentasi dari bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 dan bukan dari senyawa SFI itu sendiri maupun dari media yang digunakan. Oleh karena itu, p-coumaric acid dapat dikategorikan sebagai SFI yang dapat meningkatkan aktivitas elektrogenik dari *S. epidermidis* ATCC 12228.

c. **Sitotoksitas p-Coumaric Acid Terhadap *S. epidermidis* ATCC 12228**

Penentuan toksisitas sebuah senyawa perlu dilakukan agar diketahui keamanannya sebelum diaplikasikan pada tahap berikutnya. Penentuan sitotoksitas P-coumaric acid pada

penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *minimum bactericidal concentration* (MBC). Bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) disiapkan menjadi beberapa tingkat konsentrasi dan ditambahkan dalam media TSB agar yang telah berisi 2% p-coumaric acid.



Gambar 7. Tidak adanya efek penghambatan pertumbuhan *S. epidermidis* ATCC 12228 oleh p-coumaric acid (S1). *S. epidermidis* ATCC 12228 (1×10^7 CFU/ml) diinkubasi dengan dan tanpa 2% p-coumaric acid (selama 12 jam). RCM agar digunakan untuk mendeteksi dan menghitung koloni bakteri setelah didilusi menjadi beberapa tingkat konsentrasi ($1:10^0$: 10^5). Rata-rata \pm SE dari hasil diperoleh dari tiga kali percobaan independent. Uji t-test digunakan untuk menentukan signifikansi secara statistik (ns, tidak signifikan).

Pada pengujian ini, *S. epidermidis* sebagai bakteri probiotik kulit [29] yang dapat memberikan manfaat kesehatan pada kulit, masih dapat tumbuh dengan adanya 2% p-coumaric

acid hingga pengenceran (dilusi) $1:10^5$. Jika dibandingkan dengan kontrol yaitu media RCM tanpa penambahan 2% p-coumaric acid, jumlah koloni *S. epidermidis* ATCC 12228 memiliki nilai \log_{10} yang sama, dan tidak

berbeda signifikan secara analisis statistik. Dari pengujian ini membuktikan bahwa senyawa SFI p-coumaric acid tidak bersifat toksik pada bakteri ini. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa penambahan senyawa SFI tidak mengakibatkan terhambatnya atau kematian bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 dan justru menimbulkan efek menguntungkan. Peningkatan daya tahan bakteri *S. epidermidis* ATCC 12228 terhadap UV-B dosis akut setelah adanya penambahan SFI kedalam sistem fermentasi telah dilaporkan [17]. Penambahan SFI 2% gliserol pada fermentasi di penelitian tersebut tidak mengakibatkan kematian *S. epidermidis* ATCC 12228, tetapi uniknya dapat meningkatkan daya tahan bakteri terhadap sinar UV-B hingga konsentrasi 5 mJ/cm³. Pada penelitian lainnya, penambahan SFI gliserol juga dilaporkan tidak mengakibatkan penghambatan pertumbuhan pada *S. epidermidis* ATCC 12228 dan hasil fermentasi dari bakteri ini dengan penambahan gliserol dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* [30]. Penambahan senyawa SFI berjenis LCC juga dilaporkan tidak bersifat toksik pada *S. epidermidis* dan dapat menurunkan jumlah nucleocapsid phosphoprotein (NPP) dari SARS-CoV-2 [31].

KESIMPULAN

Kemampuan senyawa *Selective Fermentation Initiator* (SFI) dalam meningkatkan aktivitas fermentasi dan produksi elektron bakteri probiotik kulit *S. epidermidis* ATCC 12228 telah didemonstrasikan. Aplikasi elektron hasil fermentasi tersebut di bidang bioteknologi dan medis yang telah dilaporkan diantaranya adalah dapat memberikan efek

peningkatan resistansi probiotik *S. epidermidis* ATCC 12228 dalam melawan UV-B dan efek terapeutik elektron tersebut terhadap kerusakan sel kulit yang diradiasi sinar UV-B dosis akut. Oleh karenanya, penemuan senyawa SFI baru menjadi sangat menarik untuk dilakukan sehingga dapat diaplikasikan pada bidang medis ataupun kosmetika nantinya. Hasil skrining 24 jenis senyawa yang dilakukan pada penelitian ini telah memperoleh satu senyawa SFI baru yaitu p-coumaric acid. Senyawa tersebut selain dapat meningkatkan aktivitas fermentasi dari *S. epidermidis* ATCC 12228, juga dapat meningkatkan aktivitas produksi listrik bakteri tersebut. Pengembangan dari penelitian ini masih perlu dilakukan, khususnya terkait jalur biokimia yang terlibat dalam produksi elektron bakteri tersebut dalam menggunakan senyawa p-coumaric acid serta aplikasinya di bidang kosmetika dan biomedis. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi landasan dasar skrining penemuan senyawa SFI baru di masa mendatang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada Prof. Eric Chun Ming Huang dari National Central University Taiwan yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan naskah publikasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Shi, L., et al., *Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals*. Nature Reviews Microbiology, 2016. 14(10): p. 651-662.
- [2] Liu, X., et al., *Biological synthesis of high-conductive pili in aerobic bacterium Pseudomonas aeruginosa*.

- Appl Microbiol Biotechnol, 2019. 103(3): p. 1535-1544.
- [3] Kim, M.Y., et al., *Metabolic shift of Klebsiella pneumoniae L17 by electrode-based electron transfer using glycerol in a microbial fuel cell*. Bioelectrochemistry, 2019. 125: p. 1-7.
- [4] Light, S.H., et al., *A flavin-based extracellular electron transfer mechanism in diverse Gram-positive bacteria*. Nature, 2018. 562(7725): p. 140-144.
- [5] Wang, W., et al., *Bacterial Extracellular Electron Transfer Occurs in Mammalian Gut*. Analytical Chemistry, 2019. 91(19): p. 12138-12141.
- [6] Pankratova, G., L. Hederstedt, and L. Gorton, *Extracellular electron transfer features of Gram-positive bacteria*. Analytica Chimica Acta, 2019. 1076: p. 32-47.
- [7] Pankratova, G., et al., *Extracellular Electron Transfer by the Gram-Positive Bacterium Enterococcus faecalis*. Biochemistry, 2018. 57(30): p. 4597-4603.
- [8] Xayarath, B., F. Alonzo, 3rd, and N.E. Freitag, *Identification of a peptide-pheromone that enhances Listeria monocytogenes escape from host cell vacuoles*. PLoS Pathog, 2015. 11(3): p. e1004707.
- [9] Nakatani, Y., et al., *Unprecedented Properties of Phenothiazines Unraveled by a NDH-2 Bioelectrochemical Assay Platform*. J Am Chem Soc, 2020. 142(3): p. 1311-1320.
- [10] Franza, T., et al., *A partial metabolic pathway enables group b streptococcus to overcome quinone deficiency in a host bacterial community*. Mol Microbiol, 2016. 102(1): p. 81-91.
- [11] Hiraishi, A., *High-performance liquid chromatographic analysis of demethylmenaquinone and menaquinone mixtures from bacteria*. J Appl Bacteriol, 1988. 64(2): p. 103-5.
- [12] Chen, C., et al., *Use of Acetate, Propionate, and Butyrate for Reduction of Nitrate and Sulfate and Methanogenesis in Microcosms and Bioreactors Simulating an Oil Reservoir*. Appl Environ Microbiol, 2017. 83(7).
- [13] Finke, N., V. Vandieken, and B.B. Jørgensen, *Acetate, lactate, propionate, and isobutyrate as electron donors for iron and sulfate reduction in Arctic marine sediments, Svalbard*. FEMS Microbiology Ecology, 2007. 59(1): p. 10-22.
- [14] Sorokin, D.Y., E.N. Detkova, and G. Muyzer, *Propionate and butyrate dependent bacterial sulfate reduction at extremely haloalkaline conditions and description of Desulfobotulus alkaliphilus sp. nov.* Extremophiles : life under extreme conditions, 2010. 14(1): p. 71-77.
- [15] Edwards, M.J., et al., *Role of multiheme cytochromes involved in extracellular anaerobic respiration in bacteria*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2020. 29(4): p. 830-842.
- [16] Byrd, A.L., Y. Belkaid, and J.A. Segre, *The human skin microbiome*. Nature Reviews Microbiology, 2018. 16(3): p. 143-155.
- [17] Balasubramaniam, A., et al., *Skin Bacteria Mediate Glycerol Fermentation to Produce Electricity and Resist UV-B*. 2020. 8(7): p. 1092.
- [18] Balasubramaniam, A., et al., *Repurposing INCI-registered compounds as skin prebiotics for probiotic Staphylococcus epidermidis*

- against UV-B. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 21585.
- [19] Marito, S., et al., *Electricity-producing Staphylococcus epidermidis counteracts Cutibacterium acnes*. *Scientific Reports*, 2021. 11(1): p. 12001.
- [20] Stenesh, J., *The Citric Acid Cycle*, in *Biochemistry*, J. Stenesh, Editor. 1998, Springer US: Boston, MA. p. 273-291.
- [21] Liu, H., S. Cheng, and B.E. Logan, *Production of Electricity from Acetate or Butyrate Using a Single-Chamber Microbial Fuel Cell*. *Environmental Science & Technology*, 2005. 39(2): p. 658-662.
- [22] Narendhirakannan, R.T. and M.A.C. Hannah, *Oxidative stress and skin cancer: an overview*. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 2013. 28(2): p. 110-115.
- [23] Marito, S., S. Keshari, and C.-M. Huang, *PEG-8 Laurate Fermentation of Staphylococcus epidermidis Reduces the Required Dose of Clindamycin Against Cutibacterium acnes*. 2020. 21(14): p. 5103.
- [24] Negari, I.P., S. Keshari, and C.M. Huang, *Probiotic Activity of Staphylococcus epidermidis Induces Collagen Type I Production through FFaR2/p-ERK Signaling*. *Int J Mol Sci*, 2021. 22(3).
- [25] Wang, Y., et al., *Staphylococcus epidermidis in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of Propionibacterium acnes: implications of probiotics in acne vulgaris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. 98(1): p. 411-24.
- [26] Keshari, S., et al., *Butyric Acid from Probiotic Staphylococcus epidermidis in the Skin Microbiome Down-Regulates the Ultraviolet-Induced Pro-Inflammatory IL-6 Cytokine via Short-Chain Fatty Acid Receptor*. 2019. 20(18): p. 4477.
- [27] Kao, M.S., et al., *Microbiome precision editing: Using PEG as a selective fermentation initiator against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Biotechnol J*, 2017. 12(4).
- [28] Byrne, J.M., et al., *Redox cycling of Fe(II) and Fe(III) in magnetite by Fe-metabolizing bacteria*. *Science*, 2015. 347(6229): p. 1473-6.
- [29] Yang, A.-J., et al., *A Microtube Array Membrane (MTAM) Encapsulated Live Fermenting Staphylococcus epidermidis as a Skin Probiotic Patch against Cutibacterium acnes*. 2019. 20(1): p. 14.
- [30] Traisaeng, S., et al., *A Derivative of Butyric Acid, the Fermentation Metabolite of Staphylococcus epidermidis, Inhibits the Growth of a Staphylococcus aureus Strain Isolated from Atopic Dermatitis Patients*. 2019. 11(6): p. 311.
- [31] Kao, M.S., et al., *Colonization of nasal cavities by Staphylococcus epidermidis mitigates SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein-induced interleukin (IL)-6 in the lung*. *Microb Biotechnol*, 2022.