

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme prokariotik uniseluler yang mempunyai bentuk sederhana, ukuran sel bakteri dinyatakan dalam satuan mikron. Berdasarkan bentuk selnya, bakteri dibedakan menjadi bentuk batang (basil), bulat (kokus) dan lengkung (vibrion). Sel-sel bakteri yang berbentuk batang dan bulat seringkali membentuk kumpulan sel. Kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel yang berbentuk batang antara lain: diplobasil (berpasangan dua-dua) dan streptobasil (seperti rantai), sedangkan kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel yang berbentuk bulat antara lain: diplokokus (berpasangan dua-dua), streptokokus (seperti rantai), stafilokokus (bergerombol), tetrakokus (seperti bujur sangkar dengan empat sel)⁽⁷⁾.

Untuk membantu mengidentifikasi dan membedakan berbagai bakteri yang serupa, banyak digunakan senyawa organik berwarna (zat pewarna) untuk mewarnai bakteri pada pemeriksaan mikroskopis. Bakteri yang diwarnai dibagi menjadi 2 kelompok yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri mempunyai dinding sel yang mengandung peptidoglikan yaitu suatu polimer yang terdiri dari N-asetil glukosamin, asam muramat dan peptida. Komposisi ini bervariasi pada masing-masing bakteri. Gram negatif mempunyai dinding sel yang lebih rumit dibandingkan dengan gram positif. Pada bakteri gram negatif kandungan peptidoglikan lebih sedikit daripada bakteri gram positif⁽⁸⁾.

Temperatur merupakan salah satu faktor dari lingkungan yang paling mempengaruhi perkembangan dan kemampuan bertahan hidup bakteri. Bakteri memiliki temperatur minimum dan maksimum yang merupakan batas pertumbuhan, serta temperatur optimum dimana terjadi pertumbuhan paling cepat. Atas dasar ini, maka bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut: psikofil, yang tumbuh pada 0 – 30 °C; mesofil, yang tumbuh pada 25 – 40 °C; dan termofil, yang tumbuh pada 45 °C atau lebih^[9].

2.2 Isolasi dan Pengamatan Morfologi Bakteri

2.2.1 Isolasi Bakteri^[8]

Untuk mempelajari morfologi, sifat biokimia atau komposisi basa DNA suatu bakteri, maka harus menggunakan kultur murni atau biakan murni dari bakteri tersebut. Dalam penelitian klasifikasi dan karakteristik bakteri, langkah awal adalah mengisolasi bakteri untuk mendapatkan biakan murni. Tujuan mengisolasi bakteri adalah memisahkan satu jenis koloni yang secara visual berbeda^[9].

Ada dua cara yang digunakan untuk mengisolasi bakteri, yaitu cara goresan (streak plate method) dan cara taburan (pourplate method), untuk mengisolasi ada beberapa hal yang perlu diperhatikan yaitu :

1. Sifat spesies bakteri yang akan diisolasi
2. Asal bakteri tersebut.
3. Medium pertumbuhan yang sesuai.
4. Cara menginokulasi dan cara inkubasi

5. Cara menguji bahwa bakteri yang diinkubasi telah berupa biakan murni dan sesuai dengan yang dimaksud.
6. Cara memelihara biakan murni⁽⁸⁾

2.2.2 Pengamatan Morfologi

Masing-masing spesies bakteri bila ditumbuhkan pada medium padat dalam cawan petri mempunyai tipe koloni yang karakteristik. Perbedaan koloni dapat berupa bentuk, ukuran, ketinggian, tepi dan struktur dalam dari koloni⁽¹⁰⁾

Pengamatan morfologi koloni dapat dilakukan dengan melihat secara langsung pada permukaan koloni atau menggunakan mikroskop. Pengamatan morfologi koloni ini membantu dalam identifikasi bakteri yaitu meliputi⁽¹⁰⁾:

- a. Ukuran koloni: sangat kecil (seperti titik), kecil, cukup besar atau melebar
- b. Bentuk: bulat (teratur), tidak teratur atau amoboid
- c. Tipe: rata, berombak, bersilia
- d. Ketinggian (dilihat dari samping): lurus menebal, mencembung, cekung, cembung berkerut.
- e. Keadaan permukaan: suram, mengkilat, berlendir.
- f. Struktur dalam koloni: halus, bergranula, berbenang-benang halus, bercabang-cabang.
- g. Warna: bening (transparan), putih, krem, kecoklatan, kekuningan, kuning, dan lain lain

Setelah biakan bakteri dalam cawan petri tumbuh, maka dilanjutkan dengan langkah-langkah sebagai berikut^[11]:

1. Memisahkan koloni yang tampak berbeda ke medium baru, yaitu medium miring agar nutrien
2. Medium diinkubasi pada temperatur yang sesuai
3. Setelah tumbuh dilakukan isolasi dan diinkubasi lagi, dilakukan berulang-ulang hingga mendapatkan kultur murni, dan dipastikan tidak terkontaminasi bakteri lain
4. Melakukan pengecatan gram dan diamati dibawah mikroskop, untuk melihat bentuk dan reaksinya terhadap pengecatan gram

2.3 Pengecatan gram

Metode pengecatan gram adalah metode yang digunakan untuk mewarnai sel bakteri. Pengecatan gram membantu dalam identifikasi dan klasifikasi bakteri.

Pengecatan gram terdiri dari 4 tahap^[11]:

- a. Pengecatan dengan cat utama yaitu dengan larutan cat kristal violet yang berwarna ungu
- b. Mengintensifkan cat utama dengan menambahkan larutan mordan yaitu JKJ
- c. Pencucian dengan larutan alkohol
- d. Pengecatan dengan cat penutup (cat lawan atau counterstain) dengan cat safranin yang berwarna merah

Pengecatan gram ini termasuk dalam pengecatan deferensial, karena dapat membedakan bakteri yang bersifat gram positif dan gram negatif. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang mengikat cat utama kurang kuat, sehingga dapat dilunturkan oleh alkohol dan dapat diwarnai oleh cat lawan. Pada pengamatan dibawah mikroskop sel-sel bakteri ini berwarna merah. Bakteri gram positif yaitu bakteri yang mengikat cat utama dengan kuat, sehingga tidak dapat dilunturkan oleh alkohol dan tidak dapat diwarnai lagi oleh cat lawan. Pada pengamatan dibawah mikroskop, sel-sel bakteri ini berwarna biru ungu (violet)^[12].

2.4 Pengujian hidrolisis gelatin^[13]

Beberapa spesies dari bakteri mampu menghidrolisis protein gelatin dengan mengeluarkan enzim ekstraseluler. Adanya enzim ini dapat ditunjukkan dengan menginokulasi suatu medium nutrisi gelatin dengan bakteri yang diuji. Medium ini disimpan dalam almari es selama 10 menit. Apabila gelatin tetap cair maka terjadi hidrolisis protein oleh bakteri sedangkan bila gelatin memadat maka tidak terjadi hidrolisis protein oleh bakteri.

2.5 Kurva Pertumbuhan Mikroba⁽¹³⁾

Pertumbuhan mikroba dalam suatu kultur melewati beberapa fase antara lain:

a. Fase Adaptasi

Adalah fase penyesuaian mikroba dengan kondisi lingkungan baru di sekelilingnya, jumlah awal sel yang dipindah ke medium baru

mempengaruhi cepat lambatnya fase adaptasi. Bila medium dan lingkungannya pertumbuhan sama dengan medium sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

b. Fase Pertumbuhan Awal

Pada fase ini mikroba mulai membelah diri dengan kecepatan yang rendah karena baru menyesuaikan diri.

c. Fase Pertumbuhan Logaritmik

Pada fase ini mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh pH, kandungan nutrisi, suhu dan kelembaban udara pada fase ini paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

d. Fase Pertumbuhan Lambat

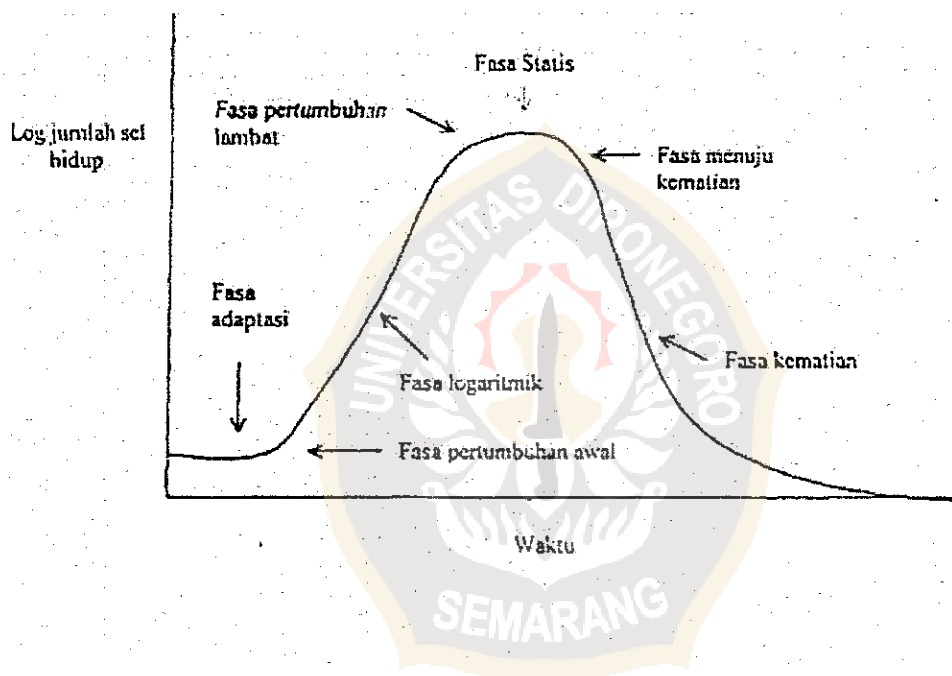
Pertumbuhan populasi mikroba diperlambat karena zat nutrisi sudah sangat berkurang dan ada hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba, jumlah populasi naik karena jumlah sel yang tumbuh lebih banyak dari pada mati.

e. Fase Pertumbuhan Tetap

Jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati, ukuran sel pada sel ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat zat nutrisi sudah habis. Karena kekurangan nutrisi sel kemungkinan mempunyai komposisi berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik.

f. Fase Menuju Kematian dan Fase Kematian

Pada fase ini sebagian besar populasi mikroba mulai mengalami kematian karena nutrisi di dalam medium sudah habis, adanya zat racun dan habisnya energi cadangan di dalam sel, kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrisi, lingkungan dan jenis mikroba.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri

2.6 Enzim

Kata “Enzyme” berasal dari istilah Yunani yang artinya “di dalam sel”^[14]. Enzim merupakan molekul polimer yang beragam yang dihasilkan sel hidup. Keragaman ini bukan hanya di dalam bentuk dan ukurannya, tetapi juga di dalam peranannya. Di dalam sel, sumber enzim terlihat dalam setiap reaksi biokimia

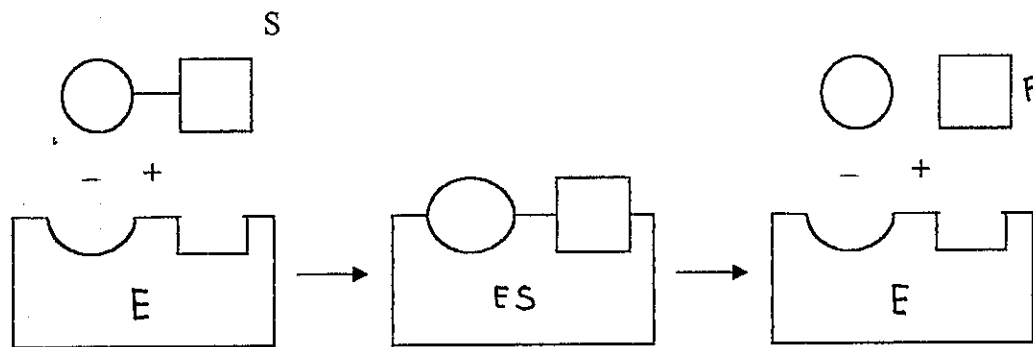
mulai dari konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel, sampai ke konversi sifat keturunan. Karena peranannya yang demikian beragam inilah enzim merupakan salah satu produk alamiah yang mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi. Ditambah lagi dengan sifatnya yang cocok untuk dimanfaatkan didalam proses industri yaitu efisiensi yang tinggi, spesifitas dan kerja yang selektif, sifat aktif pada keadaan 'ringan' yaitu pada suhu kamar dengan pH 'normal'^[3].

2.6.1 Mekanisme Kerja Enzim^[2]

Enzim mempunyai kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja. Untuk dapat bekerja terhadap suatu zat atau substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat. Enzim mempunyai ukuran yang lebih besar daripada substrat. Oleh karena itu tidak seluruh bagian enzim dapat berhubungan dengan substrat. Hubungan antara substrat dengan enzim hanya terjadi pada bagian tertentu saja. Tempat atau bagian enzim yang mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat dinamai bagian aktif. Hubungan mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat untuk menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim. Dalam hal ini enzim tidak dapat berfungsi terhadap substrat. Hal ini yang menjadi penjelasan mengapa tiap enzim mempunyai kekhasan terhadap substrat tertentu.

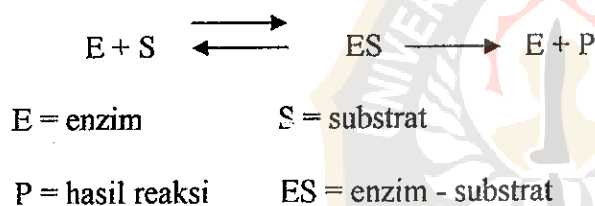
Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim – substrat. Kompleks ini merupakan kompleks yang

aktif, bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Secara sederhana sekali penguraian suatu senyawa atau substrat oleh suatu enzim dapat digambarkan seperti berikut:



Gambar 2. Mekanisme kerja enzim

atau



2.6.2 Klasifikasi Enzim^[14]

Ada berbagai cara penamaan enzim. Namun secara resmi, Commission on Enzymes of International Union of Biochemistry (CEIVB) penamaan enzim berdasarkan tipe reaksi yang di katalis dan enzim dibagi menjadi 6 kelompok utama, yaitu :

1. Oksidoreduktase. Enzim-enzim ini melaksanakan katalisis reaksi oksidasi-reduksi yaitu reaksi yang melibatkan oksidasi suatu senyawa disertai dengan reduksi senyawa lain.

2. Transferase, enzim ini melaksanakan katalisis reaksi-reaksi yang mengalihkan suatu gugus yang mengandung C, N, P, atau S dari suatu senyawa lain tanpa melibatkan oksidasi - reduksi.
3. Hidrolase, enzim ini melaksanakan katalisis reaksi pemecahan hidrolitik atau reaksi sebaliknya.
4. Liase. Enzim yang melaksanakan katalisis pemutusan reaksi rangkap C=C, C=O, C=N dan seterusnya tanpa melibatkan hidrolisis atau oksidasi - reduksi.
5. Isomerase, enzim ini melaksanakan katalisis reaksi isomerase yang merupakan penataan kembali atom-atom yang membentuk suatu molekul.
6. Ligase, enzim ini melaksanakan katalisis reaksi-reaksi pembentukan ikatan antara dua molekul substrat yang terkait dengan pemutusan ikatan pirofosfat dalam ATP atau senyawa energi tinggi lainnya.

2.6.3 Satuan Enzim

Komposisi kimia suatu enzim, baik yang masih aktif maupun yang tidak aktif adalah sama, karena itu keaktifan enzim tidak dapat ditentukan hanya dengan analisis atau penentuan komposisi kimia saja, keaktifan enzim dapat ditentukan secara kualitatif dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalisis oleh enzim tersebut dan secara kuantitatif ditentukan dengan mengukur laju reaksi tersebut, karena itulah jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam bentuk keaktifan enzim dan dinyatakan dalam satuan atau unit enzim. Satu unit aktivitas enzim adalah besarnya aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan 1 mikromol substrat atau produk per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum⁽¹⁵⁾

Konsentrasi enzim dinyatakan sebagai unit per satuan mL atau unit per mg berat protein enzim. yang dikenal sebagai satuan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim dipengaruhi oleh proses pemurnian enzim, enzim yang masih bersifat "crude ekstrak" mempunyai aktivitas spesifik yang rendah. Dengan berbagai metode pemurnian protein, enzim dapat mudah dimurnikan dan dipisahkan dari protein-protein non enzim, sehingga aktivitas spesifiknya akan semakin tinggi, jadi aktivitas spesifik enzim dapat menjadi ukuran tingkat kemurnian enzim⁽³⁾

2.6.4 Aktivitas Enzim^[14]

Sifat-sifat istimewa enzim yang menonjol adalah kapasitas katalitik yang sangat tinggi. Pada umumnya enzim dapat mempercepat laju reaksi paling sedikit 10^6 kali lebih cepat daripada reaksi tersebut dilakukan tanpa katalis. Enzim dapat menurunkan energi aktivasi suatu reaksi kimia dengan cara membentuk kompleks Enzim - Substrat (ES) dengan tergabungnya substrat dan enzim, terjadi pola reaksi yang berbeda yaitu tingkat transisi yang memiliki energi lebih rendah dibanding bila tidak ada enzim. Energi aktivasi diartikan sebagai jumlah energi dalam kalori yang dibentuk oleh satu mol zat pada temperatur tertentu, untuk membawa semua molekul (dari satu mol zat) ke keadaan aktif.

2.6.5 Lokasi Aktif Enzim^[14]

Lokasi aktif enzim adalah bagian enzim yang dapat mengikat substrat.. Lokasi aktif enzim hanya merupakan bagian yang relatif kecil dari seluruh volume

enzim yang merupakan bentuk tiga dimensi. Substrat yang terikat pada enzim harus memiliki susunan yang sangat teliti terhadap letak atom dalam lokasi aktif. Emil Fisher mengajukan hipotesa kunci dan gembok (key and lock) ada pendapat lain yang menyatakan bahwa lokasi dari beberapa enzim mempunyai bentuk konfigurasi yang tidak kaku.

2.6.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

2.6.6.1 Konsentrasi enzim^[14]

Seperti pada katalis, kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

2.6.6.2 Konsentrasi Substrat^[14]

Hasil eksperimen menunjukkan bahwa dengan konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Akan tetapi pada batas konsentrasi tertentu, tidak terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Seluruh sisi aktif enzim telah terjenuhi oleh substrat sehingga penambahan substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi.

2.6.6.3 Pengaruh Temperatur^[16]

Reaksi kimia dapat dipengaruhi oleh temperatur, maka reaksi yang menggunakan katalis enzim juga dipengaruhi oleh temperatur. Pada temperatur

rendah reaksi kimia berjalan lambat dan pada temperatur yang lebih tinggi reaksi lebih cepat. Karena enzim adalah suatu protein, maka kenaikan temperatur akan menyebabkan denaturasi. Jika terjadi denaturasi, maka bagian aktif enzim akan terganggu, sehingga konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya menurun. Kenaikkan temperatur sebelum terjadinya proses denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi. Kenaikkan temperatur pada saat mulai terjadinya proses denaturasi akan mengurangi kecepatan reaksi, maka temperatur yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim disebut temperatur optimum.

2.6.6.4 Pengaruh pH^[14]

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat bermuatan positif, negatif, atau ion bermuatan ganda (Zwitter ion). Dengan demikian pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektifitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim - substrat. Di samping berpengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH yang terlalu rendah atau tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya denaturasi, dan akan mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Suatu pH tertentu yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi disebut pH optimum.

2.7 Enzim Protease^[14]

Enzim pengurai protein digolongkan menjadi dua bentuk yaitu eksopeptidase dan endopeptidase. Enzim eksopeptidase memotong dari luar,

terbagi dua golongan yaitu karboksi(ekso) peptidase yang memotong peptida dari arah gugus karboksil terminal dan amino (ekso) peptidase yang memotong ikatan peptida dari arah gugus amino terminal. Sedangkan enzim endopeptidase memotong ikatan peptida dari dalam.

Berdasarkan sifat-sifat kimia dari lokasi aktif, enzim pengurai protein dibagi menjadi:

- a. Golongan protein serin, mempunyai residu serin dalam lokasi aktif, bersifat endopeptidase yang termasuk enzim ini adalah tripsin, kimotripsin, elastase substilin dan lain-lain
- b. Golongan protease sulfhidril, mempunyai residu sulfhidril pada lokasi aktifnya, dihambat oleh senyawa oksidator, alkilator dan logam berat. Yang termasuk enzim ini adalah papain, fisin dan bromelin
- c. Golongan protease metal, keaktifannya tergantung pada adanya metal, dihambat oleh EDTA. Yang termasuk dalam enzim ini adalah karboksi peptidase A dan beberapa amino peptidase.
- d. Golongan protease asam, pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil, dihambat oleh p-bromofenasil bromida. Yang termasuk dalam enzim ini adalah pepsin, renin, protease kapang dan lain lain.

2.8 Penentuan Aktivitas Enzim^[3]

Metode yang digunakan dalam pengukuran protease dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometer. Prosedurnya berupa penentuan produk asam amino dengan analisa serapan sinar dari hukum Lambert - Beer didapat :

$$A = \epsilon \times b \times c$$

Maka,

$$c = \frac{A}{\epsilon b}$$

Dimana:

A = Absorbansi

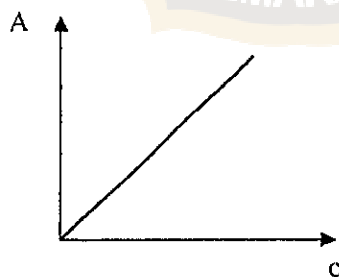
ϵ = koefisien ekstingsi molar produk ($\text{cm}^2/\mu\text{mol}$)

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)

Pada pengukuran ini ϵ dan b konstan dan konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi.

Dalam hal ini yang diukur adalah konsentrasi substrat kasein yang berkurang. Dengan menggunakan kurva standar kasein, dapat dicari konsentrasi kasein hasil reaksi enzimatik. Sumbu Y menyatakan nilai absorbansi (A) dan sumbu X menyatakan nilai konsentrasi kasein (c).



Gambar 3. Kurva standar kasein

Dari grafik tersebut dapat dicari rumus persamaan garisnya, yaitu: $Y = aX + b$

Dimana, Y = absorbansi (A)

X = konsentrasi (c)

a = gradien kemiringan

b = intersep

Nilai absorbansi dari produk hasil reaksi enzimatik diekstrapolasikan terhadap kurva standar tersebut sehingga dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah didapat, nilai konsentrasi substrat dapat diketahui. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai aktivitas enzim yang menyebabkan berkurangnya 1 mg substrat yang dihasilkan per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum.

Metode yang sama digunakan juga dalam penentuan kadar protein. Kadar protein dihitung berdasarkan rumus persamaan garis dari kurva standar "Bovine Serum Albumine". Nilai kadar protein digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim dimana aktivitas spesifik menunjukkan jumlah unit aktivitas per milligram protein.

2.9 Karakterisasi protease^[16]

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum protease hasil isolasi. Protease dapat bekerja efektif jika karakteristik biokimiawi seperti: temperatur optimum, pH optimum, waktu inkubasi optimum, pengaruh senyawa kimia dan ion, serta ketahanan panas enzim diketahui.

Untuk mengetahui pH optimum enzim dilakukan reaksi enzim dengan substrat pada variasi pH, dimana pH tertentu didapatkan aktivitas spesifik enzim tertinggi. Penentuan temperatur optimum dilakukan dengan cara yang sama pada

kondisi pH optimum dengan berbagai variasi temperatur sedangkan waktu inkubasi optimum didapat dengan mereaksikan substrat dengan enzim pada pH dan temperatur optimum dengan variasi waktu inkubasi.

