

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Bakteri

Bakteri adalah mikroorganisme prokariotik uniseluler, berdasarkan bentuknya dibagi menjadi tiga kelompok utama yaitu batang, bulat dan spiral. Sel - sel yang berbentuk batang maupun bulat seringkali membentuk kumpulan sel. Kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel 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) dan sarsina (seperti kubus dengan delapan sel) (Timotius, 1982).

Pembiakan bakteri harus terbebas dari kontaminasi sehingga perlu dilakukan sterilisasi. Sterilisasi yang umum dilakukan terdiri dari:

1. Sterilisasi secara fisik, misal dengan pemijaran, autoklafe, oven
2. Sterilisasi secara kimia, misal dengan menggunakan desinfektan, larutan alkohol
3. Sterilisasi secara penyaringan

Bakteri yang serupa dapat dibedakan dan diidentifikasi menggunakan zat pewarna. Pengidentifikasian awal bakteri ini akan diketahui sifat, bentuk dan ukurannya. Bakteri yang diwarnai dibagi menjadi 2 kelompok yaitu bakteri *Gram* negatif dan *Gram* positif. Kedua golongan *Gram* tersebut mempunyai

perbedaan pada dinding selnya, *Gram* negatif mempunyai susunan dinding sel yang lebih rumit dibandingkan *Gram* positif (Pelczar, 1986).

2.2 Isolasi Bakteri

Morfologi bakteri dapat diketahui dengan meneliti biakan murni dari bakteri tersebut, sehingga pada umumnya langkah awal yang dilakukan dalam mengklasifikasi dan mengkarakteristik bakteri adalah mengisolasi bakteri untuk mendapatkan biakan murni. Tujuan mengisolasi bakteri adalah memisahkan satu jenis koloni yang secara visual berbeda.

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 (Wheeler, 1988):

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

2.3 Pengamatan Morfologi

Masing-masing bakteri bila ditumbuhkan pada medium padat dalam cawan petri mempunyai tipe koloni yang karakteristik. Perbedaan koloni dapat berupa ukuran, bentuk, keadaan permukaan, dan warna koloni (Dwidjosoeputra, 1998).

Pengamatan morfologi koloni dapat dilakukan dengan melihat secara langsung pada permukaan koloni atau menggunakan mikroskop. Pengamatan morfologi koloni ini membantu dalam identifikasi bakteri yaitu (Dwidjosoeputra, 1998):

1. Ukuran koloni: sangat kecil (seperti titik), kecil, cukup besar, atau melebar
2. Bentuk: bulat, tidak teratur
3. Keadaan permukaan: suram, mengkilat, berlendir
4. Warna: bening, kekuningan, putih, krem, kecoklatan

Setelah biakan bakteri dalam cawan petri tumbuh, maka dilanjutkan dengan langkah-langkah sebagai berikut (Salle, 1961):

1. Memisahkan koloni yang tampak berbeda ke medium baru, yaitu medium agar miring
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 pewarnaan *Gram* dan diamati dibawah mikroskop untuk melihat bentuk dan reaksinya terhadap pengecatan *Gram*

Metode pewarnaan *Gram* adalah metode yang digunakan untuk mewarnai sel bakteri. Pewarnaan *Gram* akan membedakan bakteri menjadi berwarna ungu disebut *Gram* positif dan berwarna merah disebut *Gram* negatif.

Pewarnaan *Gram* terdiri dari 4 tahap:

1. Pewarnaan dengan cat utama yaitu dengan larutan kristal violet yang berwarna ungu.
2. Mengintensifkan cat utama dengan menambahkan larutan mordan yaitu iodin
3. Pencucian dengan larutan alkohol
4. Pewarnaan dengan cat penutup menggunakan cat safranin yang berwarna merah.

2.4 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Bakteri dalam pertumbuhannya memiliki beberapa fase yaitu (Suhartono, 1989):

a. Fase Adaptasi

Pada fase ini, bakteri melakukan penyesuaian dengan kondisi lingkungan baru di sekelilingnya. Bila medium dan lingkungan pertumbuhan sama dengan medium sebelumnya, mungkin tidak diperlukan waktu adaptasi.

b. Fase Pertumbuhan Awal

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

c. Fase Pertumbuhan Logaritmik

Pada fase ini, bakteri membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik.

d. Fase Pertumbuhan Lambat

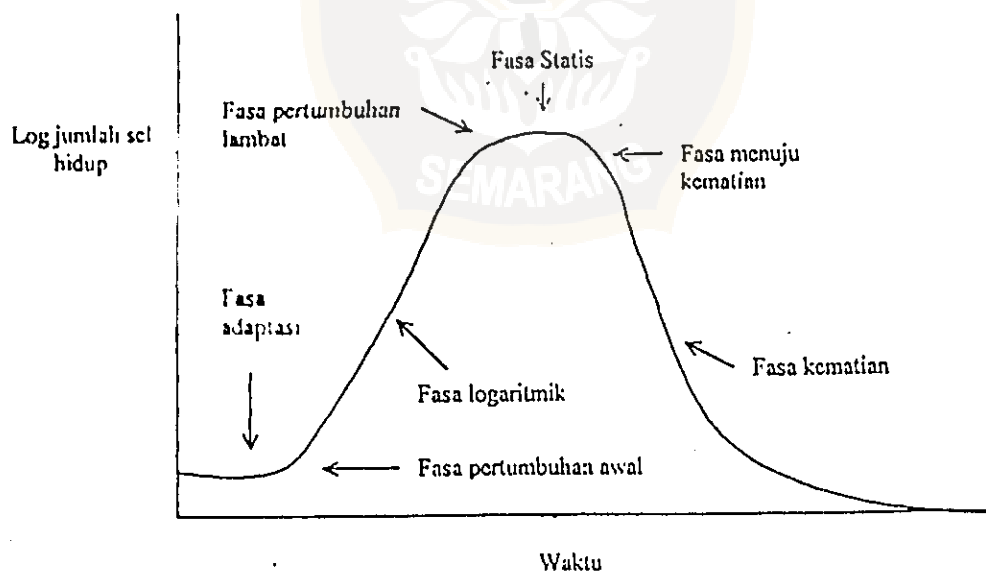
Pertumbuhan populasi bakteri diperlambat karena zat nutrisi sudah sangat berkurang dan ada hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

e. Fase Pertumbuhan Tetap

Jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati, ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat nutrisi sudah habis.

f. Fase Menuju Kematian dan Fase Kematian

Pada fase ini, sebagian besar populasi bakteri mulai mengalami kematian karena nutrisi di dalam medium sudah habis dan adanya zat racun.



Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri

2.5 Bakteri Termofilik

Temperatur merupakan salah satu faktor yang 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 (Dwidjoseputro, 1998):

1. Bakteri termofilik yaitu bakteri yang hidup pada temperatur 40 – 95 °C, sedang temperatur optimumnya ialah 50 – 65 °C.
2. Bakteri mesofilik yaitu bakteri yang hidup pada temperatur 25 – 40 °C.
3. Bakteri psikofil yaitu bakteri yang hidup pada temperatur 0 – 30 °C, sedang temperatur optimumnya ialah 10 – 20 °C

Bakteri termofilik merupakan salah satu penghasil enzim protease termostabil. Enzim yang berasal dari mikroba memiliki kelebihan dibandingkan dengan enzim non mikrobial yaitu dapat mereproduksi dalam jumlah besar, jenis mikroba dan lingkungannya sangat bervariasi sehingga memungkinkan untuk menghasilkan berbagai jenis enzim yang diinginkan, mikroba penghasil enzim dapat ditumbuhkan secara cepat, dan isolasi enzimnya mudah (Yamamoto, 1975).

Enzim protease telah banyak diisolasi dari bakteri termofilik antara lain protease serin dengan temperatur optimum 85 °C dan pH optimum 7,5 berhasil diisolasi dari kawah Gunung Tangkuban Perahu (Wahyuntari, 1999). Di Universitas Osaka, Jepang, berhasil mengisolasi protease serin dari spesies *Bacillus* dengan temperatur optimum 85 °C dan pH optimum 12 (Tadayuki).

Protease serin berhasil diisolasi dari *Thermus sp* dengan temperatur optimum 90 °C dan pH optimum 7 di daerah geothermal New Zealand (Peek, 1972).

2.6 Enzim

Enzim dapat mempercepat reaksi kimia dalam makhluk hidup, tanpa enzim maka reaksi berlangsung sangat lambat (Shahib, 1992).

2.6.1 Komponen Enzim

Enzim merupakan protein majemuk terdiri atas protein (apoenzim) dan suatu gugus bukan protein (kofaktor). Kofaktor yang gugusnya terikat kuat pada bagian protein artinya yang sukar terurai dalam larutan disebut gugus prostetik, sedangkan yang tidak kuat ikatannya disebut koenzim. Baik gugus prostetik maupun koenzim merupakan bagian yang memungkinkan enzim bekerja terhadap substrat (Poedjadi, 1994).

2.6.2 Satuan enzim

Komposisi kimia suatu enzim baik yang masih aktif maupun yang tidak aktif adalah sama sehingga keaktifan enzim tidak dapat ditentukan hanya dengan analisa atau penentuan komposisi kimia saja. Keaktifan enzim dapat ditentukan dengan reaksi kimia yaitu dengan substrat yang dapat dikatalis oleh enzim tersebut dan ditentukan dengan mengukur laju reaksi tersebut. Jumlah enzim lebih banyak dinyatakan dalam unit aktivitas enzim. Satu unit aktivitas enzim

adalah aktivitas enzim yang menyebabkan perubahan 1 μ g substrat atau produk persatuan waktu inkubasi pada kondisi tertentu (Fardiaz, 1988).

Konsentrasi enzim biasa dinyatakan sebagai aktivitas (Unit/mL) dan aktivitas spesifik enzim (unit aktivitas per milligram protein). Aktivitas spesifik enzim dipengaruhi oleh proses pemurnian enzim, enzim kasar mempunyai aktivitas spesifik yang rendah. Dengan berbagai metode pemurnian protein, enzim dapat lebih dimurnikan dengan cara memisahkannya dari protein-protein non enzim sehingga aktivitas spesifiknya akan semakin tinggi. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan tingkat kemurnian suatu enzim (Suhartono, 1989).

2.6.3 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

2.6.3.1 Konsentrasi Enzim

Kecepatan reaksi berbanding lurus dengan meningkatnya konsentrasi enzim sehingga kecepatan reaksi akan meningkat dengan bertambahnya jumlah enzim sebagai katalis pada suatu substrat.

2.6.3.2 Konsentrasi substrat

Pada 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 karena seluruh sisi aktif enzim telah dijenuhi oleh substrat sehingga penambahan substrat tidak berpengaruh terhadap kecepatan reaksi.

2.6.3.3 Temperatur

Reaksi kimia pada umumnya sangat dipengaruhi oleh temperatur. Pada temperatur rendah reaksi kimia lambat dan pada temperatur yang lebih tinggi reaksi lebih cepat. Pada reaksi enzimatik, karena enzim adalah protein maka kenaikan temperatur akan menyebabkan denaturasi. Jika terjadi denaturasi, maka sisi aktif enzim akan terganggu, sehingga kecepatan reaksinya menurun. Kenaikan temperatur sebelum terjadinya proses denaturasi dapat menaikkan kecepatan reaksi. Kenaikan 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.

2.6.3.4 Pengaruh pH

Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk enzim substrat. Pada suatu pH tertentu yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi, pH tersebut disebut pH optimum (Poedjadi, 1994).

2.6.4. Mekanisme Kerja Enzim

Enzim mempunyai kekhasan yaitu hanya bekerja pada satu reaksi saja, untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat harus ada hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat. Enzim memiliki ukuran yang lebih besar daripada

substrat. Tempat enzim mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat disebut sisi aktif. Hubungan hanya mungkin terjadi pada sisi aktif yang mempunyai ruang yang tepat yang dapat menampung substrat.

Hubungan atau kontak antara enzim dengan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim substrat. Komplek ini merupakan kompleks yang aktif bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Mekanisme pembentukan dan penguraian kompleks dapat digambarkan sebagai berikut:



Dimana : E = enzim

ES = kompleks enzim substrat

S = substrat

P = produk

2.7 Enzim Protease

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. Enzim endopeptidase akan memotong ikatan peptida dari dalam.

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

1. Golongan protease serin, mempunyai residu serin dalam lokasi aktif, bersifat endopeptidase, yang termasuk enzim ini adalah tripsin dan kimotripsin.

2. Golongan protease sulfidril, mempunyai residu sulfidril pada lokasi aktifnya, yang termasuk enzim ini adalah papain dan bromelin.
3. Golongan protease metal, keaktifannya tergantung adanya metal, bersifat eksopeptidase, yang termasuk enzim ini adalah karboksi peptidase A.
4. Golongan protease asam, pada lokasi aktifnya terdapat dua gugus karboksil, yang termasuk enzim ini adalah pepsin, renin (Winarno, 1986).

2.8 Penentuan Aktivitas Enzim

Metode yang digunakan dalam pengukuran aktivitas enzim protease dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri. Prosedurnya berupa pengukuran sejumlah substrat dengan analisis serapan sinar (Suhartono, 1989).

Penyerapan sejumlah energi menghasilkan percepatan orbital tingkat dasar ke orbital tereksitasi yang memiliki tingkat energi lebih tinggi. Menurut Bouger, Lambert dan Beer persamaan untuk mengukur serapan suatu molekul, yaitu (Underwood, 1989):

$$-\log T = A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana: T = Transmittansi

A = Absorbansi

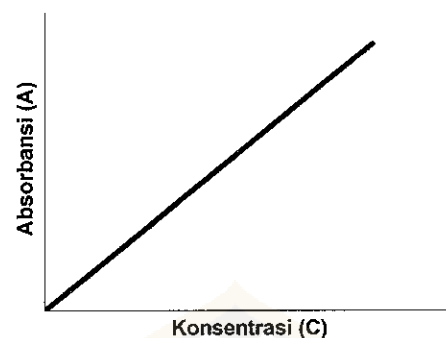
ε = Koefisien Ekstingsi Molar ($\text{cm}^2 / \mu\text{g/mL}$)

b = Tebal kuvet (cm)

c = Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)

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

Dalam penelitian ini, absorbansi yang diukur adalah absorbansi substrat kasein mula-mula (A_{kontrol}) dan absorbansi substrat kasein yang tersisa (A_{sampel}). Pengurangan absorbansi substrat kasein mula-mula dengan absorbansi substrat kasein yang tersisa diperoleh absorbansi substrat kasein yang berkurang.



Gambar 2.2 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 substrat kasein yang berkurang diekstrapolasikan terhadap kurva standar kasein sehingga dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah diketahui, nilai konsentrasi substrat kasein yang berkurang dapat diketahui.

Dengan menggunakan rumus persamaan garis yang telah didapat maka diperoleh:

1. Unit aktivitas enzim yang didefinisikan sebagai berikut :

$$1 \text{ U aktivitas enzim protease} = \frac{1 \mu\text{gkasein}}{\text{menit}}$$

2. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai:

Satuan unit aktivitas enzim tiap milligram protein yang dikandung

$$\text{Aktivitas spesifik enzim protease} = \frac{\text{unitaktivitasenzimprotease}}{\text{mgprotein}}$$

Spektrofotometer UV-Vis juga digunakan untuk mengukur absorbansi protein, nilai absorbansi diekstrapolasikan terhadap kurva standar *Bovine Serum Albumine* (BSA) sehingga dapat dihitung kadar proteinnya. Nilai kadar protein digunakan dalam penentuan aktivitas spesifik enzim. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan jumlah unit aktivitas per milligram protein yang menunjukkan tingkat kemurnian dari enzim tersebut (Edward, 1975).