

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sedimen

Sedimen merupakan partikel organik dan anorganik yang terakumulasi secara bebas. Sedangkan endapan sedimen merupakan akumulasi mineral dan fragmen batuan dari daratan yang bercampur dengan tulang-tulang organisme laut dan beberapa partikel yang terbentuk melalui proses kimiawi yang terjadi di dalam laut (Mukminin, 2009).

Menurut asalnya sedimen dibagi menjadi empat macam yaitu : 1) sedimen lithogenous, ialah sedimen yang berasal dari sisa pelapukan (weathering) batuan dari daratan, lempeng kontinen termasuk yang berasal dari kegiatan vulkanik, 2) sedimen hydrogenous, ialah sedimen yang berasal dari komponen kimia air laut dengan konsentrasi yang melewati jenuh sehingga terjadi pengendapan (deposisi) di dasar laut contohnya Mangan (Mn) berbentuk nodul, fosforite (P_2O_5), dan glaukonit (hidrosilikat yang berwarna kehijauan dengan komposisi yang terdiri dari ion-ion K, Mg, Fe, dan Si), 3) sedimen biogenous, ialah sedimen yang berasal dari organisme laut yang telah mati dan terdiri dari organisme laut yang telah mati dan terdiri dari remah-remah tulang, gigi-geligi, dan cangkang-cangkang tanaman maupun hewanmikro, 4) sedimen cosmogenous, berasal dari luar angkasa dimana partikel dari benda-benda angkasa ditemukan di dasar laut dan banyak mengandung unsur besi sehingga mempunyai respons magnetik dan berukuran antara 10-640 μ (Munandar, *et al.* 2014).

2.2 Gelatin

Menurut Panjaitan (2016), gelatin adalah produk yang dihasilkan dari denaturasi panas atau pemecahan kolagen. Selama denaturasi panas dan proses hidrolisis susunan kolagen *triple helix* bergabung dengan tiga peptida melalui ikatan kovalen. Gelatin diperoleh melalui ekstraksi dan hidrolisis kolagen yang bersifat tidak larut air. Hidrolisis gelatin tidak larut air adalah proses penguraian zat dengan cara penambahan H₂O dimana ion-ion hasil penguraian H₂O diikat oleh kolagen sehingga terbentuk gelatin. Gelatin mempunyai sifat khas antara lain kekuatan gel, viskositas dan titik leleh yang sangat penting untuk penggunaan bahan pangan. Gelatin mengandung protein yang tinggi antara 22,6-26,2%.

Gelatin merupakan suatu produk yang diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen yang berasal dari kulit jaringan ikat dan tulang hewan. Tahapan pembuatan gelatin dari kulit hewan meliputi penyabunan komponen lemak dengan kapur, pengasaman, pemucatan, penyebaran, pengeringan serta penepungan. Gelatin tidak larut dalam air dingin tetapi jika terjadi kontak dengan air dingin akan mengembang membentuk gelembung-gelembung yang besar (Bait, 2012).

Gelatin dapat diproduksi melalui proses asam atau basa. Gelatin yang diperoleh dari kulit ikan dengan proses asam akan lebih baik dibandingkan dengan proses basa karena proses asam mampu mengubah serat kolagen tripel heliks menjadi rantai tunggal. Selain itu keuntungan dari proses asam adalah persiapan bahan baku hanya memerlukan waktu singkat, biaya lebih murah, dan dalam waktu yang singkat dari proses basa. Kualitas gelatin dipengaruhi oleh tahapan proses pembuatan gelatin antara lain swelling (pembengkakan), ekstraksi, dan pengeringan (Agustin dan Meity, 2015).

2.3 Bakteri Gelatinolitik

Menurut Susatyo (2006), bakteri gelatinolitik adalah bakteri yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim gelatinase. Bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan suatu zat yang spesifik dalam menguraikan suatu senyawa, yaitu enzim. Enzim berperan dalam kegiatan fisiologis diantaranya pencernaan makanan ataupun perombakan zat makanan. Salah satu diantaranya adalah gelatinase, yaitu suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang bermanfaat dalam menguraikan gelatin.

Enzim gelatinolitik ini mungkin termasuk protease baru yang mampu menghidrolisis agar-agar, terutama dari sumber ikan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroorganisme dengan aktivitas gelatinolitik dari Dermaga ikan dan untuk menandai enzim gelatinolitik yang dihasilkan oleh strain yang dipilih. Beberapa spesies *Bacillus* dapat menghasilkan protease ekstraseluler dengan aktivitas gelatinolitik, termasuk *Bacillus lichoniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, dan *Bacillus spp.* Beberapa strain *Bacillus* mensekresikan enzim gelatinolitik yang berguna untuk produksi gelatin dan kolagen hidrolisat yang berasal dari peptida. Hidrolisat protein termasuk gelatin hidrolisat, telah digunakan sebagai bahan dalam obat, minuman, makanan, kosmetik, dan produk kesehatan (Sai-Ut, *et al.* 2013).

Bakteri gelatinolitik mendegradasi lapisan gelatin dengan cara mengeluarkan enzim gelatinase yang dapat merombak gelatin menjadi bentuk yang dapat larut dalam air (Smith dan Goodner, 1958). Beberapa contoh bakteri gelatinolitik adalah *Clostridium*, *Peptococcus*, *Streptococcus* (Dowel, *et al.* 1982), *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Chromobacterium* (Holt, *et al.* 1992).

2.4 Enzim

2.4.1 Pengertian Enzim

Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim dihasilkan oleh organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan ketika reaksi tidak menggunakan katalis. Seperti katalis, enzim juga menurunkan atau memperkecil energi aktivitas suatu reaksi kimia. Dalam reaksi tersebut enzim mengubah senyawa yang selanjutnya disebut substrat menjadi suatu senyawa yang baru yaitu produk, namun enzim tidak ikut berubah dalam reaksi tersebut (Supriyatna, *et al.* 2015).

Enzim untuk kebutuhan industri umumnya diisolasi dari berbagai jenis mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menghasilkan enzim dalam jumlah dan jenis yang bervariasi, waktu produksinya lebih cepat serta mudah dikontrol. Produksi dan perdagangan enzim saat ini didominasi oleh kelompok enzim hidrolitik seperti amilase, protease, katalase, dan lipase (Poernomo, 2003).

2.4.2 Klasifikasi Enzim

Klasifikasi enzim dapat dibedakan sebagai berikut :

- Berdasarkan tipe reaksi yang diketahui, enzim dibagi menjadi enam kelompok yaitu :
 - Oksireduktase, merupakan enzim yang dapat mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu bahan. Dalam golongan enzim ini terdapat 2 macam enzim yang paling utama yaitu oksidase dan dehidrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan

molekul oksigen. Dehydrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

- Transferase, merupakan enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.
 - Hydrolase, merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau pemecahan substrat dengan pertolongan molekul air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini adalah amilase, invertase, selulase, dan sebagainya.
 - Liase, merupakan enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air.
 - Isomerase, merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrata tau dengan perubahn isomer posisi misalnya mengubah aldose menjadi ketosa.
 - Ligase, merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan ikatan-ikatan tertentu, misalnya pembentukan ikatan C-C, C-O dan C-S dalam biosintesis koenzim A serta pembentukan ikatan C-N dalam sintesis glutamin (Winarno, 2002).
- Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dibedakan menjadi dua yaitu :
- Endoenzim, disebut juga sebagai enzim intraseluler, yaitu enzim yang bekeerja di dalam sel.
 - Eksoenzim, disebut juga sebagai enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang bekerja di luar sel.

- Berdasarkan cara terbentuknya dibedakan menjadi dua, yaitu :
 - Enzim konstitutif, yaitu enzim yang jumlahnya dipengaruhi kadar substratnya, misalnya enzim amilase.
 - Enzim adaptif, yaitu enzim yang pembentukannya dirangsang oleh adanya substrat, contohnya enzim β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* yang ditumbuhkan di dalam medium yang mengandung laktosa (Lehninger, 2005).

2.4.3 Enzim Gelatinase

Gelatinase adalah suatu jenis dari kelompok protease yang beragam, metalloproteinase ekstraseluler mampu menghidrolisis gelatin dan senyawa lainnya seperti feromon, kolagen, kasein dan fibrinogen. Gelatinase dan kolagenase adalah metaloprotease penting dan enzim ini banyak digunakan tidak hanya pada industri kimia dan medis tetapi juga pada makanan dan ilmu biologi dasar. Enzim gelatinase terdiri dari senyawa (polipeptida, peptida dan asam amino) yang dapat melintasi selaput sel dan digunakan oleh organisme. Bentuk gelatinase diekspresikan pada beberapa bakteri termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dan *Serratia marcescens* (Balan, et al. 2012).

Beberapa genus bakteri yang diketahui dapat menghasilkan enzim gelatinase yaitu *Clostridium*, *Peptococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* (Susatyo, 2006). Genus-genus tersebut dapat mengeluarkan enzim gelatinase karena adanya perubahan konsistensi gelatin dari padat menjadi cair setelah ditambahkan dengan bakteri tersebut pada uji gelatin (Benson, 1998).

2.5 Aplikasinya

Saat ini gelatinase memperoleh banyak perhatian sebagai target dalam pengembangan obat karena potensi perannya dalam degradasi jaringan ikat yang terkait dengan metastasis tumor. Potensi penggunaan dan permintaan gelatinase meningkat, yaitu kebutuhan untuk menemukan strain bakteri baru yang menghasilkan enzim dengan sifat dan perkembangan yang baru (Balan, *et al.* 2012).

Aplikasi gelatin pada bahan makanan antara lain sebagai agen pembentuk gel, pengental, pengemulsi, pembentuk busa dan *edible film*. Pada bidang farmasi gelatin banyak digunakan dalam industri kapsul dapat dibuat kapsul lunak dan keras (Agustin dan Meity, 2015).

Industri pangan banyak memanfaatkan industri gelatin, biasanya pada pembuatan es krim, sedangkan produk yang perlu penstabilan pada hasilnya maka gelatin ini berfungsi sebagai stabilizer. Ada juga produk gelatin untuk meningkatkan viskositas dan juga berfungsi sebagai pengikat (binder), juga emulsifier dan *thickener*. Pada bidang fotografi, maka gelatin digunakan untuk memperpanjang daya simpan dalam menyimpan foto, yaitu sebagai *fotoresist* yang dapat menghindari (coating) dari adanya cahaya yang sensitif (Agustin, 2013).

Pada bidang farmasi, gelatin sebagai pembungkus kapsul atau tablet obat berfungsi sebagai mikroenkapsulasi vitamin dan mineral serta premix agar awet. Pada bidang kosmetik, khususnya digunakan untuk menstabilkan emulsi pada produk-produk sampo, penyegar dan pelindung kulit (lotion/emulsi cream). Sabun (terutama yang cair), lipstik, cat kuku, busa cukur, krim pelindung sinar matahari dan lain-lain (Hastuti, *et al.* 2007).

2.6 Bakteri

Menurut Waluyo (2011), nama bakteri berasal dari bahasa Yunani "*bacterion*" yang artinya batang atau tongkat. Bakteri berkembang biak dengan cara membelah diri dan hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop. Menurut Pelczar dan Chan (1986), bakteri merupakan sel prokariotik yang uniseluler (sel tunggal) dengan struktur internal sederhana. Reproduksi aseksual, khususnya dengan pembelahan sel sederhana. Bakteri yang diinokulasikan pada medium yang sesuai dan pada keadaan yang optimum bagi pertumbuhannya maka terjadi kenaikan jumlah yang amat tinggi dalam waktu yang relatif singkat yaitu 24 jam. Ukuran khas $0,15-1,5 \mu\text{m} \times 1,0-0,3 \mu\text{m}$. Sel-sel individu bakteri dapat berbentuk seperti elips, bola, batang (silindris), atau spiral (heliks).

Bakteri memiliki daerah penyebaran relatif luas sehingga hampir dapat ditemui dimana saja. Faktor keberadaan bakteri di lingkungan akan menimbulkan berbagai perubahan kimiawi pada substansi yang ditumbuhinya. Faktor abiotik merupakan faktor yang sangat mempengaruhi aktifitas dan pertumbuhan bakteri. Faktor ini meliputi faktor fisik seperti temperatur, tekanan osmose, cahaya dan radiasi, juga faktor kimia yang mencakup Ph, salinitas, bahan organik dan zat-zat kimia (Volk dan Wheeler, 1993).

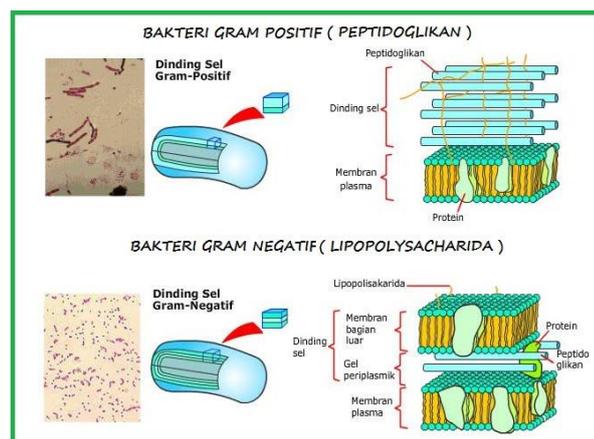
2.6.1 Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif

Berdasarkan pewarnaan gram, bakteri dapat dibedakan menjadi dua golongan, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif zat lipidnya akan larut selama pencucian dengan alkohol, pori-pori pada dinding sel akan membesar, permeabilitas dinding sel menjadi besar, sehingga zat warna yang sudah diserap mudah dilepaskan dan kuman menjadi tidak berwarna. Sedangkan pada bakteri Gram positif akan mengalami denaturasi

protein pada dinding selnya oleh pencucian dengan alkohol. Protein menjadi keras dan kaku, pori-pori mengecil, permeabilitas kurang sehingga kompleks ungu kristal iodium dipertahankan dan sel kuman tetap berwarna ungu (Staf Pengajar FKUI, 1993).

Hal itu disebabkan karena bakteri gram positif dan gram negatif mempunyai dinding sel yang berbeda susunan kimianya. Dinding sel bakteri gram negatif lebih rumit susunannya dari pada bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram positif hanya tersusun dari satu lapisan saja, yaitu lapisan peptidoglikan yang relatif tebal. Sedangkan dinding sel bakteri gram negatif mempunyai dua lapisan dinding sel, yaitu lapisan luar yang tersusun dari lipopolisakarida dan protein, dan lapisan dalam yang tersusun dari peptidoglikan tetapi lebih tipis daripada lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif (Timotius, 1982).

Menurut Pelczar (1988) ciri-ciri bakteri gram positif dan gram negatif dapat dilihat pada Tabel 1 dan gambar dinding sel bakteri gram negatif dan positif dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Gram negatif. (Google image, 2017)

Tabel 1. Perbedaan ciri-ciri dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif.

Ciri	Gram Positif	Gram Negatif
<ul style="list-style-type: none"> Struktur sel 	<ul style="list-style-type: none"> Tebal (15-80 nm) Berlapis tunggal (mono) 	<ul style="list-style-type: none"> Tipis (10-15 nm) Berlapis tiga (multi)
<ul style="list-style-type: none"> Komposisi dinding sel 	<ul style="list-style-type: none"> Kandungan lipid rendah (1-4%) Peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal, komponen utama merupakan lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri Ada asam tekoat 	<ul style="list-style-type: none"> Kandungan lipid tinggi (11-22%) Peptidoglikan ada di dalam jumlahnya sedikit merupakan sekitar 10% berat kering Tidak ada asam tekoat
<ul style="list-style-type: none"> Kerentanan terhadap penisilin 	<ul style="list-style-type: none"> Lebih rentan 	<ul style="list-style-type: none"> Kurang rentan
<ul style="list-style-type: none"> Pertumbuhan dihambat oleh zat-zat warna dasar, misalnya ungu kristal 	<ul style="list-style-type: none"> Pertumbuhan dihambat dengan nyata 	<ul style="list-style-type: none"> Pertumbuhan tidak begitu dihambat
<ul style="list-style-type: none"> Persyaratan nutrisi 	<ul style="list-style-type: none"> Relatif rumit pada banyak spesies 	<ul style="list-style-type: none"> Relatif sederhana
<ul style="list-style-type: none"> Resistensi terhadap gangguan fisik 	<ul style="list-style-type: none"> Lebih resisten 	<ul style="list-style-type: none"> Kurang resisten

2.7 Isolasi dan Identifikasi Bakteri

2.7.1 Isolasi Bakteri

Mikroorganisme pada suatu lingkungan alami merupakan populasi campuran dari berbagai jenis, baik mikroorganisme pada tanah, air, udara, makanan, maupun pada tubuh hewan dan tumbuhan. Pemisahan bakteri diperlukan untuk mengetahui jenis, mempelajari kultural, morfologi, fisiologi, dan karakteristik. Teknik pemisahan tersebut disebut isolasi yang disertai dengan pemurnian (Irianto, 2006).

Menurut Susatyo (2006) menambahkan keterangan bahwa isolasi merupakan kegiatan pemisahan mikroorganisme yang akan diuji dari mikroorganisme lain dengan menggunakan media selektif, sehingga diharapkan akan diperoleh biakan atau kultur murni.

Isolasi bakteri merupakan cara untuk memisahkan koloni campuran sehingga didapatkan isolat murni yang berupa koloni tunggal. Bakteri dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti tanah, air, sayuran, buah-buahan, tanaman, dan berbagai jenis makanan. Bakteri yang tumbuh dalam sebagian besar berbentuk koloni campuran sehingga perlu diisolasi untuk memisahkan biakan murni. Menurut Hadioetomo (1995), ada tiga cara yang digunakan untuk proses isolasi bakteri adalah Cara Goresan (*Streak Plate Method*), Cara Taburan (*Pour Plate Method*), dan Cara Sebaran (*Spread Plate Method*).

Metode goresan yang dilakukan dengan cara menggoreskan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan media agar pada cawan petri steril. Setelah diinkubasi, pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang berasal dari satu sel bakteri atau biakan murni.

Metode taburan dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada cawan petri steril, kemudian menuangkan media agar yang sedang mencair pada temperature kurang dari 50 °C. Apabila dituang dengan suhu tinggi, dimungkinkan mikroorganisme yang diinokulasikan tidak dapat bertahan hidup dan mati. Setelah diinkubasi, maka akan terlihat koloni-koloni yang tersebar pada permukaan yang berasal dari satu sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut.

Metode sebaran dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bahan yang mengandung bakteri pada permukaan media agar pada cawan petri steril. Disebut sebaran, karena setelah sampel diinokulasikan disebar secara merata dengan menggunakan *hockey glass*. Setelah dilakukan inkubasi, pada

permukaan media agar akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang berasal dari satu sel bakteri atau biakan murni.

Ada kalanya sebelum dilakukan isolasi dilakukan tahap pengkayaan (*enrichment*) terlebih dahulu. Tujuannya adalah menginduksi mikroorganisme dalam sampel sehingga pada tahap isolasi mikroorganisme tersebut tumbuh sehingga dapat diisolasi.

2.7.2 Identifikasi Bakteri

Identifikasi dilakukan dengan beberapa cara termasuk : pengamatan morfologi sel, pewarnaan gram, dan uji biokimia. Selain itu berdasarkan morfologi, bakteri juga dibedakan menjadi 3 bentuk meliputi: Bentuk bulat (kokus), Bentuk batang (basil), Bentuk spiral (Pelczar dan Chan, 2006).

Identifikasi isolat bakteri meliputi karakteristik morfologi dan uji biokimia bakteri yakni: pewarnaan gram, pewarnaan spora, motilitas, uji TSIA, pembentukan gas, katalase, oksidase, indol, urea, sitrat, laktosa, glukosa, sukrosa, MR dan VP, OF test, reduksi nitrat dan gelatin (Yusra, *et al.* 2014).

Tahap identifikasi meliputi beberapa uji yaitu Uji Pewarnaan Gram, Uji Biokimia dan Uji *Microbact System*.

– Uji Pewarnaan Gram

Menurut Bergey's, *et al.* (1994) pewarnaan gram adalah uji yang termasuk dalam pewarnaan differensial yang membutuhkan paling sedikit tiga reagen kimia yang digunakan secara berurutan pada ulasan yang difiksasi menggunakan panas. Berdasarkan bentuk dan efek perwanaaan gram, bakteri dikelompokan menjadi kokus gram positif dan gram negatif, batang gram positif dan gram negatif. Pewarnaan gram juga dapat dibedakan menjadi dua yaitu bakteri gram positif akan bewarna ungu atau biru yang disebabkan kompleks warna kristal violet- iodium. Sedangkan gram negatif akan bewarna merah atau merah muda karena kompek warna Kristal violet-iodium terlarut oleh larutan pemucat.

– Uji Biokimia

Uji biokimia merupakan suatu cara atau perlakuan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni selama reaksi kimia yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi maupun yang menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel dan untuk kegiatan seluler, seperti pergerakan. Suatu bakteri tidak dapat dideterminasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, sehingga perlu diteliti sifat-sifat biokimianya (Cowan, 2004). Uji biokimia meliputi beberapa uji di bawah ini:

- Uji oksidase : Uji Oksidase merupakan uji yang berfungsi sebagai penentu adanya sitokrom oksidase yang dapat ditemukan pada mikroorganisme tertentu. Biakan ditumbuhkan pada media *nutrient agar* NA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. kemudian ditambahkan reagen uji oksidase (campuran 1% larutan α -naffol dan 1% larutan dimetil-p-fenilendiamin oksalat) pada koloni bakteri dan didiamkan selama 30 menit. Uji positif jika warna koloni berubah menjadi hitam (Lay, 1994).
- Uji katalase : uji katalase digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim katalase pada bakteri. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas sebagai tanda adanya oksigen bebas sedangkan reaksi negatif ditandai tanpa terbentuknya gelembung-gelembung gas sebagai tanda tidak adanya oksigen bebas.
- Uji nitrat : uji ini digunakan untuk menguji kemampuan organisme yang dapat tumbuh pada media yang mengandung pepton sebagai sumber nitrogen (Wedhastri, 2002). Cara kerjanya adalah isolat ditumbuhkan pada media yang mengandung KNO_3 . Kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37

⁰C. selanjutnya ditambahkan larutan asam sulfanilat dan larutan alfa-naftilamin, kemudian dilihat reaksinya.

- Uji urease : uji ini digunakan untuk mengetahui apakah suatu bakteri dapat menghidrolisis atau mendegradasi urea dengan enzim urease. Isolat ditumbuhkan pada media yang mengandung urea. Beberapa mikroorganisme mampu menghasilkan enzim urease yang dapat menguraikan urea menjadi ammonium dan CO₂. Uji ini dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna merah jingga menjadi merah ungu (Ramdany, 2008).
- Uji arginin : uji ini digunakan untuk mengetahui apakah yang terjadi pada asam amino yang lebih kompleks. Uji ini dinyatakan positif apabila bakteri mampu bereaksi dengan asam amino dan dinyatakan negatif apabila bakteri tidak mampu bereaksi dengan asam amino kompleks (Ramdany, 2008).
- Uji gula-gula : uji ini digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi dan memfermentasikan karbohidrat yang disertai dengan pembentukan asam ataupun gas yang meliputi uji glukosa, sukrosa, lektosam galaktosa, manitol, dan maltose (Tedja, 2007).
- Uji V-P : uji ini digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme yang bereaksi dengan asetonin dan oksigen dan menghasilkan fermentasi akhir berupa asetil metal karbonil. Cara kerjanya adalah isolate ditumbuhkan pada media yang mengandung glukosa, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37⁰C. selanjutnya ditambahkan reagen KOH 40% dan 15 tetes larutan alpha naphtol.
- Uji sitrat : uji ini digunakan untuk mengetahui apakah mikroorganisme mampu memfermentasikan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya yang ditandai dengan perubahan warna mejadi biru peruse apabila positif, dan

tetap pada warna aslinya apabila negatif. Bakteri yang mengalami perubahan warna menandakan bahwa bakteri tersebut mempunyai enzim sitrat yang merupakan enzim spesifik pembawa sitrat ke dalam sel (Pelczar, 2006).

- Uji ornitin : uji ini merupakan uji yang menggunakan media MIO untuk mengetahui reaksi terhadap ornitin, dapat digunakan untuk mengetahui adanya bakteri yang diperiksa serta kemampuannya menghasilkan indol (Wahyunio, 2011).
- Uji koagulase : uji ini digunakan untuk membedakan dua spesies yang bersifat patogen dan yang tidak patogen (Candra, 2006).
- Uji H₂S : uji yang digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam menghidrolisis logam berat pada media biakan yang ditandai dengan pembentukan warna hitam pada media (Didje, *et al.* 2006).
- Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA) : isolate bakteri digoreskan pada permukaan medium agar miring TSIA, dan juga ditusuk tegak lurus ditenga medium. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 65⁰C, uji positif ditandai adanya perubahan warna pada medium TSIA dari warna coklat tua menjadi oranye atau kuning. Terbentuknya H₂S dapat daimati dengan terbentuknya warna kehitaman ada bekas goresa, pembentukan gas dapat diamati terbentuknya rongga pada bagian bawah agar (Arfah, *et al.* 2010).
- Uji Motilitas
Uji ini dilakukan untuk mengetahui pergerakan bakteri. Bakteri bersifat motil ditandai dengan pertumbuhan media tampak keruh atau tampak seperti cawan terbalik, apabila bakteri hanya tumbuh pada tempat tusukan maka bakteri tersebut bersifat non motil. Cara kerjanya yaitu isolat ditanam pada media NA tegak, ditusukkan sedalam 5 mm, kemudian diinkubasi pada suhu

37°C selama 24 jam. Bakteri dalam melakukan pergerakannya dengan menggunakan energi yang diperoleh dari ATP yang diuraikan oleh koenzim ATP-ase dan membentuk fosfoanorganik. Motilitas bakteri ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri yang menyebar sedangkan non-motil jika pertumbuhan bakteri hanya berbentuk garis (Prescott, 2002).

- Uji Indol

Menurut Lay (1994), uji ini untuk mengetahui produksi indol dari *tryptophane*. Asam amino triptofan merupakan asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber energinya. Uji indol dilakukan dengan cara meneteskan media SIM dengan Reagen Kovacs. Uji indol dikatakan positif jika terbentuk cincin merah muda setelah ditetesi dengan Reagen Kovacs dan jika terjadi perubahan warna maka dikatakan indol negatif. Cara kerjanya adalah isolate ditumbuhkan pada media yang mengandung triptofan dan menginkubasinya selama 48 jam pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan reagen yang mengandung paradimetil amonibenzal dehidat.

- Uji Gelatinase : uji gelatinase dilakukan dengan menginokulasikan isolate bakteri terpilih dengan cara menusuk tegak lurus jarum ose pada bagian tengah medium gelatin, lalu diinkubasi selama 5 hari pada suhu 35°C, setelah itu kultur medium disimpan dalam lemari es selama 30 menit. Uji gelatinase positif ditandai dengan bentuk media semi padat gelatin tetap cair meskipun telah dikeluarkan dari lemari es dikarenakan bakteri mampu mencerna gelatin, namun jika media semi padat gelatin membeku kembali setelah dikeluarkan dari lemari es maka dikarenakan bakteri tidak mampu mencerna gelatin (Arfah, *et al.* 2010).

– Uji *Microbact Sysytem*

Menurut Briedson (1998), prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Kit *Microbact 12E* dan *Microbact 12B* adalah sistem identifikasi komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri gram negatif dan gram positif golongan enterobacter. *Microbact 12E* untuk bakteri gram negatif dan *12B* untuk bakteri gram positif. Tes ini terdiri dari 12 substrat biokimia yang berbeda, tes ditempatkan di sumur *Microbact*. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi, dimana sebelumnya isolat yang digunakan harus murni dan dilarutkan dalam garam fisiologis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, reagen yang sesuai ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal). Nama bakteri dilihat dengan computer berdasarkan angka oktalnya.