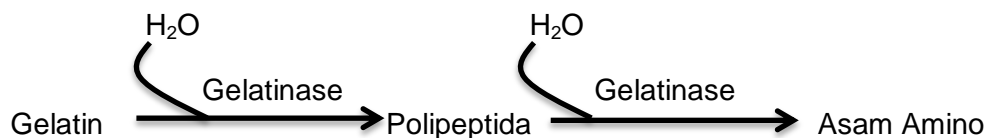


II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Enzim Gelatinase

Gelatin merupakan protein yang diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen kulit, jaringan ikat putih dan tulang hewan. Gelatin menyerap air 5-10 kali beratnya. Gelatin memiliki sifat yang khas, yaitu berubah secara reversibel dari bentuk sol ke bentuk gel (Susatyo, 2006). Gelatin hidrolisis merupakan hasil dari gelatin yang diproses secara kimia dan pemanasan atau biokimia (Schriber dan Herbert, 2007). Cara menghidrolisis gelatin menjadi gelatinase meliputi dua tahapan yaitu 1) gelatinase akan bekerja pada polipeptida, 2) kemudian polipeptida akan dipecah menjadi asam amino. Proses mekanismenya dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hidrolisis gelatin oleh gelatinase (Leboffe dan Pierce, 1999)

Pada gambar 1. Nutrisi yang menjadi media uji gelatin berbeda dengan media padat yang lainnya. Nutrisi gelatin tersebut diantaranya *pepton*, *beef extract* dan *gelatin* yang berfungsi sebagai suatu substrat yang baik untuk proses gelatinase. Setelah diinkubasi selama 48 jam, media gelatin yang disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C akan terhidrolisis. Jika media positif mengandung enzim gelatinase media akan tetap cair setelah disimpan di lemari

pendingin dengan menusuk isolat gelatin yang berada didalam tabung (Balan *et al.* 2012).

Gelatinase jenis dari protease masuk dalam kelompok endopeptidase metalloekstraseluler atau metaloproteinase yang mampu menghidrolisis gelatin, kolagen, fibrinogen, kasein dan feromon. Gelatinase sendiri merupakan metaloprotease yang penting, juga banyak digunakan tidak hanya dindustri kimia dan medis tetapi juga pada makanan dan ilmu dasar biologis. Enzim gelatinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat menghidrolisis gelatin menjadi sub komponennya (peptida, asam amino, dan polipeptida) yang dapat melintasi membran sel yang digunakan oleh organisme (Balan,*et al.*2012).

Pada manusia gelatinasi merupakan metalloproteinase matriks terlibat dalam rincian matriks ekstraseluler dari proses fisiologis normal, seperti perkembangan embrio, reproduksi jaringan dan renovasi, serta dalam proses penyakit, seperti arthritis dan metastasis. Saat ini enzim gelatinase sudah banyak menjadi perhatian besar sebagai target pengembangan obat karena berpotensi dalam mendegradasikan jaringan ikat yang berhubungan dengan tumor metastasis. Potensi dengan menggunakan gelatinasi yang tinggi permintaan berpeluang untuk mendapatkan strain bakteri baru yang menghasilkan enzim dengan sifat baru (Balan,*et al.*2012).

2.2 Bakteri

Bakteri merupakan mikrobia prokariotik uniseluler, termasuk kelas Schizomycetes, berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil kecuali beberapa yang bersifat fotosintetik. Cara hidup bakteri juga ada yang hidup bebas, parasitik, saprofitik, patogen pada manusia,

hewan dan tumbuhan. Habitatnya tersebar luas di alam, dalam tanah, dan memiliki atmosfer sampai ± 10 km diatas bumi, di dalam lumpur dan di laut. Bakteri mempunyai bentuk dasar bulat, batang, dan lengkung. Berdasarkan klasifikasi artifisial yang dimuat dalam buku "*Bergey's manual of determinative bacteriology*" tahun 1974, bakteri di klasifikasikan berdasarkan deskripsi sifat morfologi dan fisiologi.

2.2.1 Bakteri Gelatinolitik

Bakteri gelatinolitik merupakan bakteri yang dapat memanfaatkan gelatin sebagai sumber nutrisi. Bakteri ini juga dapat memproduksi enzim gelatinase sehingga dapat mendegradasi gelatin (Susatyo, 2006). Bakteri penghasil gelatinase dapat menghidrolisis gelatin menjadi senyawa yang lebih sederhana seperti asam amino. Beberapa diantaranya genus bakteri yang diketahui dapat menghasilkan enzim gelatinase yaitu *Serratia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *salmonell*, *Pseudomonas*, *Vibriodan Micrococcus* (Smith dan Goodner, 1958).

2.2.2 Bakteri *Bacillus Megaterium*

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Firmicutes</i>
Class	: <i>Bacilli</i>
Order	: <i>Bacillales</i>
Family	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>B. Megaterium</i>

2.3 Enzim

2.3.1 Definisi Enzim

Enzim adalah golongan protein yang paling banyak terdapat dalam sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator reaksi biokimia yang secara

kolektif membentuk metabolisme perantara dari sel. Dengan adanya enzim, molekul awal yang disebut substrat akan dipercepat perubahannya menjadi molekul lain yang disebut produk. Enzim tersusun atas asam – asam amino yang melipat – lipat membentuk globular, dimana substrat yang dikatalis bisa masuk dan bersifat komplementer (Rismijana, 2003).

Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10 pangkat 8 sampai 10 pangkat 11 kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi yang dilakukan tanpa katalis. Enzim bersifat efisien dan spesifik dalam kerja katalitiknya, sehingga enzim mempunyai sifat yang sangat khas karena hanya bekerja pada substrat tertentu dan bentuk reaksi tertentu. Kespesifikannya disebabkan oleh bentuknya yang unik dan adanya gugus – gugus polar (atau nonpolar) yang terdapat dalam struktur enzim (Sutandi, 2003).

2.3.2 Tata Nama dan Kekhasan Enzim

Secara umum nama tiap enzim disesuaikan dengan nama substratnya dengan penambahan 'ase' di belakangnya. Suatu enzim bekerja secara khas terhadap suatu substrat tertentu. Substrat adalah senyawa yang reaksinya dikatalisis oleh enzim. Satu enzim hanya dapat mengkatalisis reaksi dari beberapa substrat yang berbeda. Dapat dikatakan bahwa hanya beberapa senyawa yang mampu bertindak sebagai substrat bagi suatu enzim Lehninger (1990),

2.3.3 Mekanisme Kerja Enzim

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 digunakan telah

terjadi. Mekanisme pembentukan dan peruraian kompleks dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan: E = enzim
S = substrat

ES = kompleks enzim
P = produk

Suatu 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 memiliki ukuran yang lebih besar daripada substrat. Pada enzim terdapat bagian aktif (*active site*) yang berfungsi sebagai tempat atau cara enzim mengadakan hubungan atau kontak dengan substrat. Hubungan hanya mungkin terjadi apabila bagian aktif mempunyai ruang yang tepat yang dapat menampung substrat. Apabila substrat mempunyai bentuk atau konformasi lain, maka tidak dapat ditampung pada bagian aktif suatu enzim (Poedjajati, 1994).

2.3.4 Klasifikasi Enzim

Klasifikasi enzim berdasarkan tipe reaksi katalis diibedakan sebagai berikut, yaitu :

- Oksidoreduktase

Enzim oksidoreduktase adalah 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.

Dehidrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat.

- Transferase

Enzim transferase adalah enzim yang ikut serta dalam reaksi pemindahan (transfer) suatu gugus.

- Hidrolase

Enzim hidrolase 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 diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.

- Liase

Enzim liase adalah enzim yang aktif dalam pemecahan ikatan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air.

- Isomerase

Enzim isomerase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul dengan cara pengaturan kembali atom-atom substrat, sehingga dihasilkan molekul baru yang merupakan isomer dari substrat atau dengan perubahan isomer posisi misalnya mengubah aldosa menjadi ketosa.

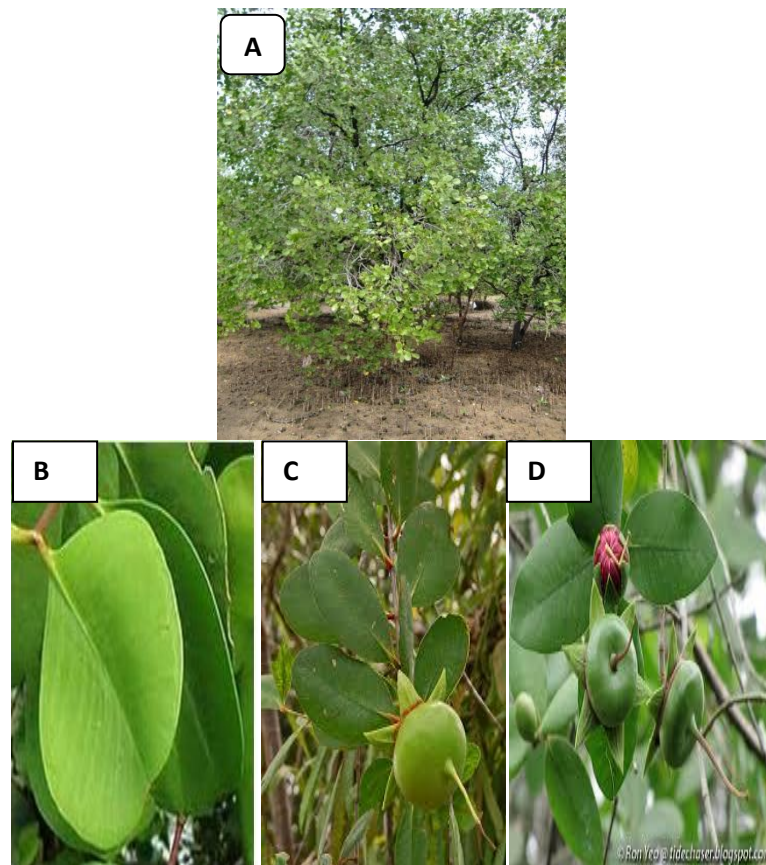
- Ligase

Enzim ligase adalah 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, 2010).

2.4 Klasifikasi *Sonneratia alba*

Klasifikasi tanaman *Sonneratia alba* menurut (Safnowandi, 2015), sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Sub Regnum : *Tracheobionta*
Super Divisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliophyta*
Ordo : *Myrtales*
Famili : *Sonneratiaceae*
Genus : *Sonneratia*
Spesies : *Sonneratia alba*



Gambar 2. Mangrove Pidada Putih (*Sonneratia alba*)
A: Pohon, B: Daun, C: Batang, dan D: Buah (Sosia *et al.*, 2014)

2.4.1 Morfologi Mangrove (*Sonneratia alba*)

Pedada (*Sonneratia alba*) tumbuh pada substrat berlumpur. kulit batang berwarna krem hingga cokelat dengan retakretak halus di permukaannya. Akar berupa akar nafas yang terlihat pada saat air laut sedang surut. Daunnya tebal berbentuk bulat telur yang berwarna hijau cerah dan letaknya saling berhadapan. Buah berbentuk bola gepeng yang berwarna hijau keabu-abuan dengan diameter 5-7,5 cm. Bunganya berbenang sari cukup banyak, terdapat diujung-ujung ranting dan berwarna putih. Tumbuhan ini dapat dimanfaatkan yaitu pada kayunya yang dapat dijadikan rusuk dan siku-siku perahu (Ruslia *et al.*, 2006).

Sonneratia alba memiliki sistem perakaran yang unik yang sama dengan tipe perakaran cakar. Akar ini dilengkapi dengan bagian pneumatophore atau napas yang muncul dipermukaan tanah. Fungsinya untuk mengambil oksigen yang ada diudar dan bertahan pada substrat berlumpur. Sedangkan daunnya berbentuk bulat dengan fungsi sebagai bahan organik yang membantu proses penyediaan nutrisi perairan. Selain itu, mangrove ini biasanya hidup pada tanah yang rendah kandungan asamnya. Hal ini disebabkan oleh karena bentuk akarnya yang tumpul dan memiliki akar napas (*pneumatophore*) sehingga pada vegetasinya mangrove jenis ini termasuk dalam vegetasi mangrove inti. *Sonneratia alba* sering dijumpai tumbuh bersama dengan *Sonneratia caseolaris*, sehingga sulit dibedakan. Salah satu yang membedakan adalah bunganya. Secara umum tumbuhan mangrove tumbuh subur di daerah estuari dengan salinitas 10-30 ppt. Namun beberapa dapat tumbuh dengan salinitas tinggi seperti *Sonneratia sp.* yang dapat hidup hingga salinitas 44 ppt. Sedangkan suhu yang dibutuhkan tumbuhan mangrove ini adalah 28-30°C (Saparinto dan Cahyo, 2007).

2.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Isolasi merupakan teknik mengambil mikroorganisme yang terdapat di alam dan menumbuhkannya dalam suatu medium buatan. Proses pemisahan atau pemurnian dilakukan untuk proses mikrobiologis, misalnya telaah dan identifikasi mikroorganisme, memerlukan suatu populasi yang hanya terdiri dari satu macam mikroorganisme saja. Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lainnya yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroba (Sutedjo, 1996). Ada dua metode dalam isolasi bakteri, yaitu :

- Pour Plate Method (Cara Tabur) Cara ini dasarnya ialah menginokulasi medium agar yang sedang mencair pada temperatur 45-50°C dengan suspensi bahan yang mengandung mikroba, dan menuangkannya ke dalam cawan petri steril. Setelah inkubasi akan terlihat koloni-koloni yang tersebar di permukaan agar yang mungkin berasal dari 1 sel bakteri, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono, *et al.* 1980).
- Streak Plate Method (Cara Gores) Cara gores umumnya digunakan untuk mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Cara ini dasarnya ialah menggoreskan suspensi bahan yang mengandung mikroba pada permukaan medium agar yang sesuai pada cawan petri. Setelah inkubasi maka pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah yang mungkin berasal dari 1 sel mikroba, sehingga dapat diisolasi lebih lanjut (Jutono, *et al.* 1980). *Penggoresan* yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Bakteri yang memiliki flagella seringkali membentuk koloni yang menyebar terutama bila digunakan lempengan yang basah. Untuk mencegah hal itu harus digunakan lempengan agar yang benar-benar kering permukaannya (Lay, 1994).

2.6 Bakteri Endofit Penghasil Gelatinase

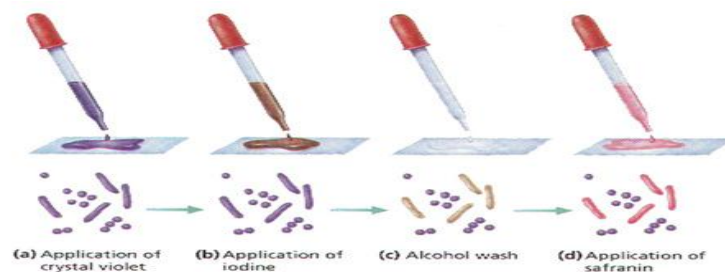
Bakteri Endofit merupakan mikroba yang mengkolonisasi bagian dalam tanaman terutama daun, batang, akar dan dapat tinggal untuk seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit bagi inangnya. Ratusan spesies mikroba endofit dapat diisolasi dari satu jenis tanaman, dan sedikitnya satu spesies dapat menunjukkan karakteristik dari tanaman inangnya (Tan dan Zou, 2001).

Indonesia sebagai negara tropis yang memiliki aneka ragam jenis tumbuhan tentulah berpotensi besar untuk pengkajian mikroba endofit. Seleksi dan skrining dari berbagai tanaman telah dan perlu untuk terus dilakukan guna mengisolasi mikroba endofit dari berbagai jenis tanaman. Salah satu tanaman yang menarik untuk diteliti adalah mangrove pidada putih (*Sonneratia alba*) yang banyak tumbuh di Indonesia, namun informasi terkait potensi mikroba endofitnya masih sangat terbatas (Gaharuku, 2012).

2.7 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram pertama kali dilakukan oleh Christian Gram yang merupakan ahli bakteriologi berkebangsaan Denmark. Pewarnaan Gram merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menentukan jenis Gram bakteri dan bentuk bakteri yang diamati dengan menggunakan mikroskop. Dalam pewarnaan Gram, bakteri dibagi menjadi dua kelompok, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif berwarna biru atau ungu disebabkan oleh kompleks warna Kristal violet-iodin. Sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah atau merah muda yang disebabkan tidak mampu mempertahankan kompleks warna tersebut saat diberi larutan etanol 95% dan pewarna safranin dapat masuk sehingga berwarna merah.

Perbedaan hasil pewarnaan tersebut disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel dan komposisi dinding sel dari dua kelompok bakteri tersebut. Dinding sel bakteri gram positif memiliki peptidoglikan yang tebal sehingga mampu mempertahankan warna kompleks tersebut. Sedangkan, di dinding sel bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang banyak sehingga ketika diberi larutan etanol 95% akan larut sehingga warna ungu dari Kristal violet menjadi luntur sehingga safranin dapat mewarnai bakteri tersebut. Berikut tahap pewarnaan gram dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Tahapan Pewarnaan Gram (Sumber :Cumming, 2004)

2.8 Identifikasi Menggunakan *Microbact* system

Salah satu cara pengidentifikasian mikroorganisme yaitu dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian maka akan menghasilkan pengidentifikasiannya yang lebih spesifik hingga tingkat spesies (Buckle, *et al.* 1987).

Kit *Microbact* 12E dan *Microbact* 12B adalah identifikasi sistem komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri gram negatif dan gram positif golongan

enterobacter. *Microbact* 12E untuk bakteri gram negatif dan *Microbact* 12B untuk bakteri gram positif. Tes ini terdiri dari substrat 12 biokimia yang berbeda tes ditempatkan di sumur *Microbact*. Pengujian dengan menggunakan *Microbact* akan semakin mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *Microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam garam fisiologis. 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. 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 kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan menggunakan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).