

2. TINJAUAN PUSTAKA

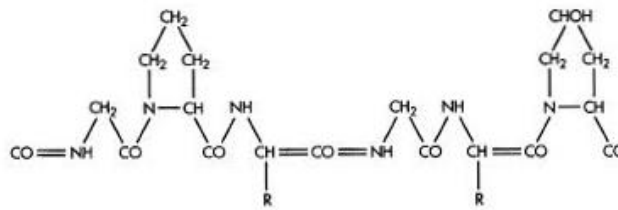
2.1 Gelatinase

Gelatinase merupakan tipe membran metaloproteinase yang dapat memproses *procollagenases* manusia ke enzim yang aktif sepenuhnya yang nantinya akan menghasilkan ikatan peptida, enzim ini dipercaya berperan penting dalam patologi kanker payudara pada manusia (Knauper *et al.*, 1996).

Pada manusia gelatinase berperan dalam matriks ekstraseluler dari proses fisiologis normal, seperti, reproduksi jaringan dan renovasi, perkembangan embrio serta dalam arthritis dan metastasis. Gelatinase sudah mencuri perhatian sebagai target pengembangan obat karena memiliki potensi mendegradasi jaringan ikat yang berhubungan dengan tumor metastasis. Potensi dengan menggunakan gelatinase yang tinggi, permintaan berpeluang untuk mendapatkan *strain* bakteri baru yang menghasilkan enzim dengan sifat baru (Shanmugasundaram *et al.*, 2012).

2.2 Gelatin

Gelatin merupakan biopolimer yang berasal dari hidrolisis kolagen, gelatin yang banyak beredar dipasaran biasanya berasal dari hewan dengan bahan penyusun utamanya adalah protein (Bailey dan Paul, 1998). Gelatin memiliki sifat *gelling agent* yaitu sifat yang dapat membeku atau menjadi gel dan *thickening agent* atau mengental (Mariod dan Adam, 2013). Struktur kimia gelatin dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Struktur kimia gelatin
(Tazwir *et al.*,2007)

Gelatin memiliki peranan yang penting dan sulit tergantikan didalam industri pangan dan obat-obatan. Peranan gelatin dibidang tersebut antara lain sebagai bahan pengisi, pengemulsi (*emulsifier*), sebagai pengikat, pengendap, pemer kaya gizi, mampu membentuk lapisan tipis dan elastis, film transparan dan kuat serta memiliki daya cerna yang tinggi (Hastutis dan Sumpe, 2007).

2.3 Bakteri

Bakteri merupakan Kelompok mikroorganisme yang berhubungan dengan manusia. Bakteri tumbuh secara luas dilingkungan sekitar manusia. Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal berukuran mikroskopis yaitu berkisar antara panjang 0,5 sampai 10 μ m dan lebar 0,1 sampai 2,5 μ m tergantung dari jenisnya. 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 (Arisman, 2012).

Bakteri merupakan makhluk yang kromosomnya tidak memanjang seperti potongan-potongan benang, tetapi bentuknya melingkar. Dengan kata lain bakteri merupakan makhluk haploid yaitu makhluk yang memiliki sel hanya berisi satu set lengkap kromosom. Jenis yang paling umum dari sel haploid adalah gamet, atau sel kelamin. Sel haploid dihasilkan oleh meiosis. Mereka adalah sel genetik beragam yang digunakan dalam reproduksi seksual. Ketika

sel-sel haploid dari orangtua bergabung dan dibuahi, keturunannya memiliki satu set lengkap kromosom dan menjadi sel diploid (Waluyo, 2005).

2.4 Bakteri Gelatinolitik

Bakteri gelatinolitik merupakan bakteri yang dapat memanfaatkan gelatin sebagai sumber nutrisi. Bakteri ini juga dapat memproduksi gelatinase sehingga mampu 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 gelatinase yaitu *Serratia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *salmonell*, *Pseudomonas*, *Vibrio* dan *Micrococcus* (Smith dan Goodner, 1958).

2.5 Enzim

2.5.1 Definisi Enzim

Enzim merupakan golongan protein yang mempunyai fungsi penting sebagai pengkatalis atau katalisator reaksi-reaksi biologis. 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 (Martoharsono, 2006).

Enzim merupakan biokatalisator yang dihasilkan oleh sel. Semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Apabila aktivitas enzim terganggu maka reaksi metabolisme sel akan terhambat sehingga pertumbuhan sel juga akan terganggu. Reaksi-reaksi enzimatik dibutuhkan agar bakteri dapat memperoleh makanan/nutrient dalam keadaan terlarut yang dapat diserap ke dalam sel, memperoleh energi kimia yang digunakan untuk biosintesis, perkembangbiakan, pergerakan, dan lain-lain. (Poedjiadi, 2006)

2.5.2. Faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim antara lain :

a. Suhu

Enzim dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia pada suatu sel hidup. Dalam batas -batas suhu tertentu, kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan meningkat seiring dengan naiknya suhu. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum . Suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan enzim terdenaturasi (Poedjadi, 1994). Pada suhu 0°C, enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal (Lay dan Sugyo, 1992).

b. pH

Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, artinya, enzim memiliki konstanta disosiasi pada kedua gugus asam dan basa, terutama gugus amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan disebabkan dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989).

c. Konsentrasi enzim

Semakin tingginya konsentrasi enzim maka semakin meningkat kecepatan reaksinya hingga batas tertentu, dan hasil hidrolisis substrat akan konstan seiring dengan naiknya konsentrasi enzim. Hal ini disebabkan penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Reed, 1975).

d. Konsentrasi substrat

Kecepatan reaksi enzimatik pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi akan semakin menurun hingga

tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan akan mengakibatkan sedikit saja peningkatan kecepatan reaksi (Lehninger, 1982)

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion-ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono, 1997). Menurut Wirahadikusumah (1989), inhibitor merupakan suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas enzim. Pada umumnya cara kerja inhibitor adalah dengan menyerang sisi aktif enzim sehingga enzim tidak dapat berikatan dengan substrat sehingga fungsi katalitiknya terganggu (Winarno, 1989).

2.5.3 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 (Shabib, 1992).

2.5.4 Mekanisme Kerja Enzim

Suatu enzim mempunyai kekhasan yaitu bekerja hanya pada satu reaksi saja. Untuk dapat bekerja terhadap suatu substrat harus ada interaksi antara enzim dengan substrat. Enzim memiliki ukuran yang lebih besar daripada substrat. Pada enzim terdapat bagian aktif 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 (Poedjaji, 1994).

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:

Dimana	E = enzim	ES = kompleks enzim
	S = substrat	P = produk

2.5.5 Klasifikasi Enzim

Sistem penamaan dan klasifikasi enzim telah diambil dari hasil persetujuan internasional dan diberi nomor kode/sandi. Pembagian didasarkan pada reaksi yang dikatalisisnya. Klasifikasi enzim berdasarkan atas reaksi katalisisnya menurut Buxbaum (2007) dibagi menjadi 6 kelas utama meliputi oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase.

Oksidoreduktase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi oksidasi atau reduksi suatu substrat. Dua macam enzim yang paling utama, yakni oksidase dan dehidrogenase. Oksidase ialah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Contoh: katalase, peroksidase, tirosinase, dan asam askorbat oksidase. Dehidrogenase ialah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hidrogen dari substrat. Contoh: Enzim suksinat dehidrogenase yang memecah asam suksinat menjadi asam fumarat

Transferase adalah reaksi yang dikatalisisnya merupakan reaksi pemindahan gugus fungsional. Contoh: transglikosidase, transfosforilase, transaminase, dan tranasetilase.

Hidrolase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat atau memecah substrat dengan pertolongan molekul air. Contoh: lipase asparginase dan amilase. Liase adalah enzim yang aktif dalam pemecahan C-C dan C-O dengan tidak menggunakan molekul air. Contoh: enzim dekarboksilase yang memecah ikatan C-C Isomerase adalah jenis reaksi yang dikatalisisnya adalah pemindahan gugus di dalam molekul, menghasilkan bentuk isomer

Ligase adalah reaksi yang dikatalisisnya merupakan reaksi pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N oleh reaksi kondensasi yang berkaitan dengan penguraian ATP.

2.6 Sedimen

Sedimen merupakan lapisan tanah dan bagian bagian tanah yang terangkut oleh air dari beberapa tempat yang mengalami erosi baik berupa erosi permukaan tanah, erosi parit, erosi jurang, dan erosi pada tebing tebing dan dasar sungai yang kemudian masuk ke dalam suatu badan air. Sedimen yang dihasilkan oleh proses erosi dan terbawa oleh aliran permukaan mengalami perpindahan posisi sehingga sedimen tersebut mengendapkan pada suatu tempat yang kecepatan airnya melambat atau berhenti. Proses inilah yang dikenal dengan sedimentasi (Banuwa, 2013)

Sedimen terdiri dari berbagai partikel yang berasal dari hasil pembongkaran bebatuan, limbah organik rumah tangga, potongan-potongan kulit serta sisa rangka dari organisme (Hutabarat dan Evans,1985) ditambahkan oleh Ongkosono (1992), proses hidrologi akan terhenti pada suatu tempat dimana air tidak lagi sanggup membawa partikel yang tersuspensi tersebut.

2.7 Kultivasi Bakteri

Kultivasi bakteri merupakan usaha dalam menumbuhkan mikroorganisme pada media kultur. Isolasi itu sendiri merupakan suatu usaha pemisahan mikroorganisme dari medium satu ke medium lainnya untuk mendapatkan biakan murni. Pada proses isolasi harus dilakukan dengan aseptik, aseptik merupakan usaha pencegahan adanya kontaminasi bakteri patogen (Purnomo,2008).

Lingkungan juga menjadi faktor penting dalam kultivasi, dimana lingkungan tersebut harus memiliki nutrisi-nutrisi yang diperlukan untuk mikroorganisme tersebut dapat tumbuh. Hal itulah yang membuat lingkungan menjadi salah satu penentu keberhasilan suatu kultivasi. Nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme antara lain vitamin, air, karbon, dan unsur logam seperti sulfur, besi, seng, mangan, natrium dan kalium (Afnani,2010).

Selain faktor lingkungan, mikroorganisme dapat tumbuh optimum apabila terjadi kombinasi antara nutrisi dan lingkungan fisik yang sesuai, beberapa persyaratan lingkungan fisik yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme antara lain: suhu, pH, atmosfer gas serta beberapa kondisi khusus (Pelczar dan Chan, 1986)

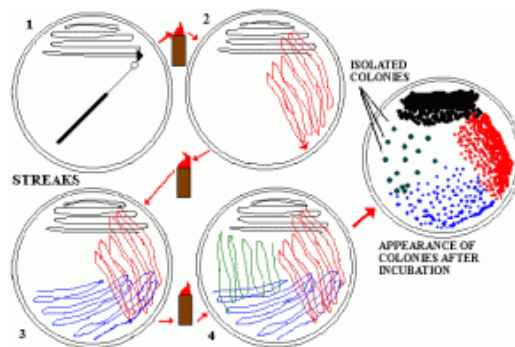
2.8 Isolasi dan identifikasi bakteri

Pada umumnya, mikroorganisme tergabung dalam populasi yang didalamnya terdapat lebih dari satu jenis mikroorganisme yang berbeda. Sangat jarang dan bahkan dikatakan sulit menemukan mikroorganisme sebagai spesies tunggal, untuk itu disinilah peran metode isolasi, yaitu metode yang memisahkan mikroorganisme satu dengan mikroorganisme lainnya, agar mendapatkan biakan murni yang setelahnya dapat dilakukan proses identifikasi bakteri tersebut. Isolasi dilakukan dengan cara mengambil sampel mikroba dari lingkungan yang ingin diteliti. Dari sampel tersebut kemudian dikultur/dibiakan dengan

menggunakan media universal atau media selektif, tergantung tujuan yang ingin dicapai. Untuk mendapatkan atau menumbuhkan jenis mikroorganisme tertentu, maka dilakukan isolasi. Dengan isolasi inilah dapat diidentifikasi jenis bakteri tertentu baik dari kelimpahan maupun morfologinya. Isolasi bakteri merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungannya sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Kultur murni ialah kultur yang sel-sel mikroba berasal dari pembelahan dari satu sel tunggal. Kultur murni atau biakan murni sangat berguna didalam mikrobiologi, yaitu untuk menelaah dan mengidentifikasi mikroorganisme, termasuk penelaahan ciri-ciri kultural, morfologis, fisiologis, maupun serologis, memerlukan suatu populasi yang terdiri dari satu macam mikroorganisme saja. Sebelum mengisolasi, harus diketahui mikroba apa yang akan diisolasi dan habitatnya menentukan sampel dan media apa yang akan digunakan. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan yang diisolasi dari tanaman ataupun hewan antara lain adalah sel mikroba relatif lebih mudah ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan relatif lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan bila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif rendah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya pergantian musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih pendek (Torben, 2007)

Ada beberapa cara yang digunakan dalam metode isolasi yaitu dengan metode gores, metode tuang, metode sebar, metode penuangan, serta *micromanipulator*. Dua diantaranya yang paling sering banyak digunakan adalah teknik cawan tuang dan cawan gores. Kedua metode ini didasarkan pada prinsip yang sama yaitu mengencerkan organisme sedemikian rupa sehingga individu species dapat dipisahkan dan akhirnya didapatkan biakan murni (Pleczar, 2006)

Metode goresan yaitu metode isolasi dengan cara menggosokkan suspensi bahan yang terdapat bakteri pada permukaan media agar dalam *petridish* steril. Setelah inkubasi, pada bekas goresan akan tumbuh koloni-koloni terpisah pada permukaan media yang berasal dari satu biakan murni. Metode ini sederhana, hemat biaya dan waktu, hanya membutuhkan keterampilan. Metode strea dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Metode *streak* (Holt, 1994)

Metode sebaran (*spread plate method*) merupakan metode isolasi dengan cara menyebarkan sampel cair yang terdapat mikroorganisme pada permukaan media agar dalam *petridish* steril. Setelah inkubasi, pada permukaan media akan tumbuh koloni-koloni terpisah sehingga menghasilkan biakan murni.

Metode agar tuang (*pour plate method*) merupakan metode yang menginokulasikan suspensi bahan yang terdapat bakteri dalam *petridish* steril kemudian di tuang dalam media agar dalam bentuk cair pada suhu kurang dari 45 °C, bertujuan agar bakteri masih mampu hidup. Setelah inkubasi, pada permukaan media akan tumbuh koloni-koloni terpisah sehingga di dapatkan biakan murni.

Menurut Hadioetomo (1985) metode cawan gores mempunyai dua keuntungan yaitu menghemat bahan dan waktu. Akan tetapi metode ini memerlukan keterampilan yang diperoleh dengan latihan. Maka dari itu perlu

diketahui hal-hal yang penting dalam proses penggoresan. Salah satunya adalah dengan membagi cawan dengan garis. Penggoresan yang sempurna akan menghasilkan koloni yang terpisah. Sel-sel bakteri akan terpisahkan satu dari yang lainnya. Sel-sel tunggal yang terpisahkan seperti ini disebut sel ind'vcuk. Pada waktu inkubasi setiap sel induk berbai diri dengan belahan biner dalam waktu 20-30 menit menjadi 2 sel anak dan begitu seterusnya. Krettiawan (2011) menjelaskan bahwa teknik penanaman dengan penggoresan bertujuan untuk mengisolasi mikroorganisme dari campurannya ke dalam medium baru. Adapun model-model penggoresan dalam proses isolasi antara lain : goresan sinabung, goresan T dan goresan kuadran. (1) Goresan sinabung tidk digunakan untuk mendapatkan koloni tunggal, melainkan untuk peremajaan koloni ke media baru, (2) Goresan T yaitu membagi cawan menjadi bagian menggunakan spidol, kemudian inokulasi daerah 1 sampai 3 dengan streak zig-zag dan (3) Goresan kuadran hampir sama dengan goresan T, namun berpola 4 bagian. Goresan awal masih terdapat banyak sel mikroorganisme, goresan selanjutnya disilangkan dari goresan pertama sehingga jumlah semakin sedikit dan akhirnya terpisah-pisah menjadi koloni tunggal (Holt,1994).

Menurut Sutedjo (1996), karakteristik koloni bakteri hasil inokulasi merupakan salah satu bagian dalam identifikasi bakteri. Beberapa bentuk koloni spesifik koloni bakteri pada media agar datar antara lain :

- Ukuran
 - Titik
 - Kecil
 - Sedang
 - Besar
- Warna koloni

Bakteri yang hidup hampir tidak berwarna dan tidak kontras dengan air, di mana sel-sel bakteri tersebut disuspensikan. Oleh karena itu pengamatan tanpa pewarnaan menjadi lebih sukar dan tidak dapat digunakan untuk melihat bagian-bagian sel dengan teliti

- Bentuk koloni
 - Bundar
 - Tidak beraturan
 - Rhizoid (tersebar seperti akar)
- Bentuk bagian tepi koloni (*margin*)
 - Rata (*entire*)
 - Tidak rata, bergelombang secara beraturan (*lobate*)
 - Bergelombang (*undulate*)
 - Bergerigi (*serrate*)
 - Seperti filamen (*filamentous*)

Biakan murni merupakan kultur yang didalamnya hanya terdapat satu spesies tunggal dari organisme yang dapat diperoleh dengan cara melakukan isolasi mikroorganisme (Black, 2008). Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan isolasi mikroorganisme sehingga biakan murni terbebas dari kontaminan. Kontaminan adalah organisme yang tidak diinginkan ada bersama biakan murni. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam isolasi mikroorganisme tersebut misalnya prosedur teknik aseptik, jenis medium yang digunakan, teknik isolasi, teknik pemilihan sumber biakan (koloni), dan penyimpanan pasca isolasi mikroorganisme (Madigan *et al.*, 2011)

Sementara itu, jenis medium yang cocok digunakan untuk memperoleh biakan murni adalah medium padat, khususnya medium padat dalam cawan petri. Medium padat dapat menghentikan pergerakan sel-sel, kemudian

mengizinkan sel-sel mikroba untuk tumbuh dan membentuk massa yang tampak sebagai sebuah entitas tersendiri yang disebut koloni (Madigan *et al.*, 2011).

Teknik aseptik merupakan suatu prosedur yang dilakukan untuk mencegah atau mengurangi terjadinya kontaminasi (Harley dan Prescott, 2002). Salah satu teknik aseptik yang dilakukan adalah dengan melakukan pekerjaan selalu dekat dengan api. Ketika sedang melakukan pembukaan pada cawan petri atau tabung medium, diusahakan untuk selalu melewatkannya kepada api pada bagian dari benda yang dibuka, sehingga kontaminasi mikroba dari udara dapat dihindari (Madigan *et al.*, 2011).

2.8 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial yang banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi, karena merupakan suatu tahap awal yang penting dalam mengidentifikasi mikroorganisme. Pewarnaan ini didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Jenis bakteri berdasarkan pewarnaan Gram dibagi menjadi dua yaitu Gram positif dan Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis. Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada di antara dua lapis membran sel (Iud, 2008). Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat dilihat pada Tabel 1.

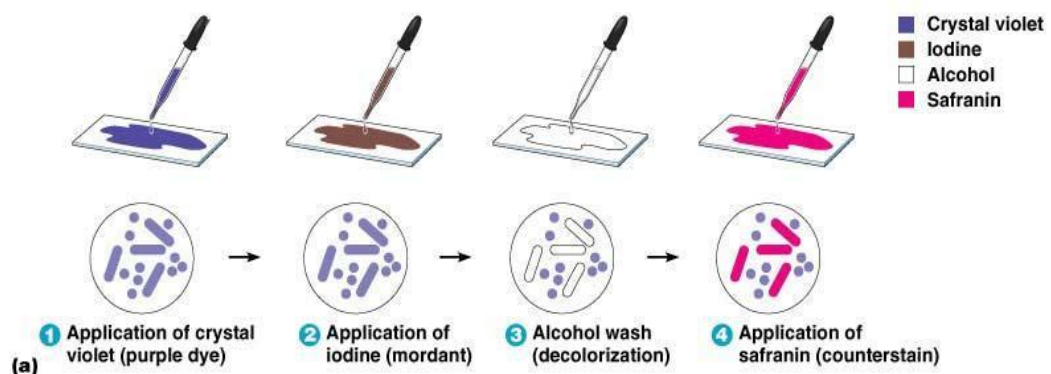
Tabel 1. Perbedaan relatif sifat bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif

SIFAT	Sifat Perbedaan Relatif	
	Bakteri gram positif	Bakteri gram negative
Komposisi dinding sel	Kandungan lipid rendah (1-4 %)	Kandungan lipid tinggi (11 – 22 %)
Ketahanan terhadap penisilin	Lebih sensitif	Lebih tahan
Penghambatan oleh pewarna basa	Lebih dihambat	Kurang dihambat
Kebutuhan Nutrien	Kebanyakan spesies	Relatif sederhana

Ketahanan terhadap perlakuan fisik (Fardiaz,1992)	relatif kompleks	
	Lebih tahan	Kurang tahan

2.8.1 Teknik Perwarnaan Gram

Langkah awal yang dilakukan dalam teknik pewarnaan Gram adalah akuades diambil lalu diteteskan pada kaca objek dan ditambahkan satu ose biakan sampel, lalu difiksasi diatas api. Lalu ditambahkan pewarnaan Kristal violet dan diteteskan lalu biarkan selama 1 menit. Setelah itu cuci dengan air mengalir, lalu ditetesi dengan lugol dan didiamkan selama satu menit dan kembali dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya tetesi dengan alkohol 96% lalu dibiarkan selama 10 sampai 20 detik setelah itu dicuci dengan air mengalir. Langkah selanjutnya adalah menambahkan safranin dan dibiarkan selama 20 sampai 30 detik dan dicuci kembali dengan air mengalir. Tahap selanjutnya dikeringkan dengan memakai kertas serap dan tambahkan minyak emersi lalu amati dibawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan yang didapatkan bakteri berwarna merah maka bakteri yang didapat adalah bakteri Gram negatif sedangkan bila didapatkan hasil bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah bakteri Gram positif (Yenni dan Yasmin,2011) Tahapan pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 3.



Keterangan :Gram positif berwarna ungu hingga biru yang disebabkan oleh kompleks ungu violet. Gram negatif ditunjukkan dengan warna merah muda setelah diberi larutan safranin
(Tortora *et al.*, 2004)

Gambar 3.Tahapan Pewarnaan Gram

2.9 Identifikasi *Microbact System*

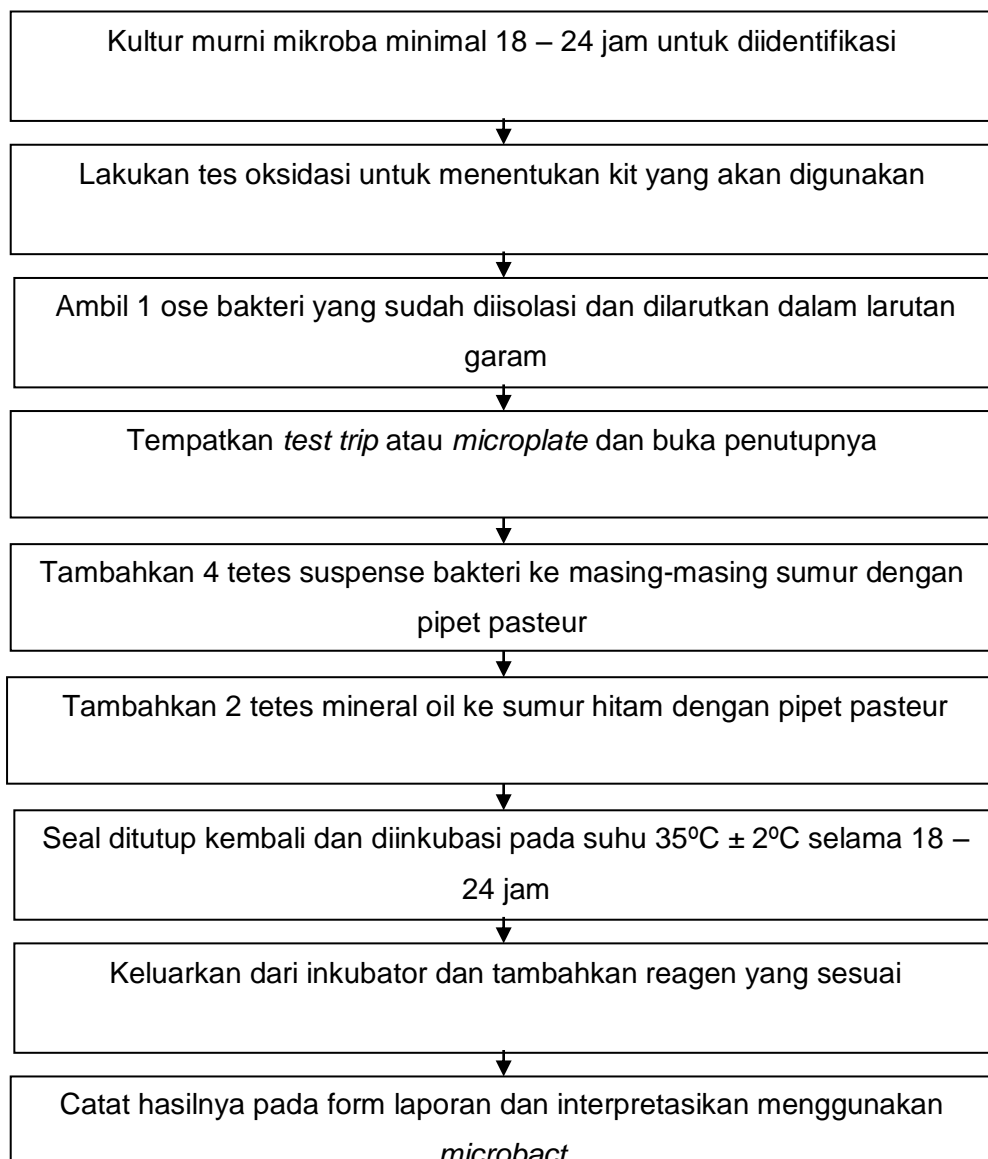
Uji *Microbact* merupakan uji yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri dengan menggunakan karakteristik eksternal seperti karakteristik kimia, fisika dan biologi dari bakteri tersebut. Pengidentifikasian mikroorganisme dilakukan dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu uji yang meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang pengujian senyawa kimia lebih banyak maka akan menghasilkan pengidentifikasian yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle *et al.*, 1987).

Sistem *Microbact Identification* adalah sistem identifikasi yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri aerob dan fakultatif anaerob (*Enterobacteriaceae* dan bakteri Gram negatif). Prinsip kerjanya adalah setiap set terdiri dari 12 (12A, 12B, dan 12E) atau 24 (24E) uji biokimia. Identifikasi mikroorganisme didasarkan pada perubahan pH dan pemanfaatan substrat. Untuk penggunaan Kit *Microbact* 12A Gram negatif dan *Microbact* 12E dapat digunakan sendirian untuk identifikasi bakteri yang beroksidase negatif, nitrat positif fermentor glukosa dan berguna untuk penapisan *Enterobacteriaceae* patogen dari enteric dan spesimen urin. *Microbact* 12B Gram-negatif dapat digunakan bersama dengan 12A untuk identifikasi oksidase positif, nitrat negatif, non fermentor glukosa (aneka bakteri

Gram negatif), dan *Enterobacteriaceae*. *Microbact 24E* adalah kombinasi dari 12A, 12B, dan 12E.

Pengujian dengan menggunakan *Microbact* akan semakin mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. *Microbact* memiliki 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 (Oxoid,2004).

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. Pengujian *microbact* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Prosedur Pengujian *Microbact*
(Sumber : Oxoid, 2004)

Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negatif menggunakan *Microbact* system 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E. Penambahan reagen pada sistim identifikasi *Microbact* Gram-negatif dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 2. Penambahan Reagen Pada Sistim Identifikasi *Microbact* Gram- Negatif

Sistim	Sumur	Reagen	Jumlah	Waktu pembacaan
12A(12E) atau 24E	8	Indole	2 ml	2 menit
12A(12E) atau 24E	10	VP I dan VP II	Masing-masing 1 mL	15-30 menit
12A(12E) atau 24E	12	TDA	1 mL	Secepatnya

Sumber : Oxoid (2004)

Setelah didapatkan spesies bakteri dari *software microbact*, sebagai perbandingan dicocokkan sifat-sifatnya berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.