

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Gelatinase

Enzim berperan dalam kegiatan fisiologis salah satunya adalah pencernaan makanan ataupun perombakan zat makanan (volk dan wheeler, 1993). Salah satu diantaranya adalah gelatinase, yaitu suatu enzim yang dihasilkan oleh bakteri yang bermanfaat dalam menguraikan gelatin. Nama lain dari enzim gelatinase adalah pepsin B, parapepsin, gelatinase A/B, matrix metallo proteinase, collagenase dan collagen metallo proteinase.

Enzim gelatinase yang dihasilkan oleh mikroorganisme menghidrolisis gelatin menjadi subkomponennya (polipeptida, peptida dan asam amino). Bentuk gelatinase terdapat pada beberapa bakteri termasuk *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* dan *Serratia marcescens*. Pada manusia, gelatinase adalah matriks metaloproteinase yang terlibat dalam pemecahan matriks ekstraselular dalam proses fisiologis normal, seperti perkembangan embrio, reproduksi dan remodeling jaringan, serta proses penyakit, seperti artritis dan metastasis (Balan, 2012). Enzim gelatinase juga tergolong dalam enzim hidrolisis, baik perombakan yang tidak dapat tercerna menjadi bahan terlarut dengan melibatkan molekul air (Kusnawidjaja, 1983).

Aplikasi gelatinase digunakan untuk kegiatan industri, baik itu industri pangan maupun non pangan. Pada industri non pangan terlebih pada bidang kesehatan enzim gelatinase diperkirakan dapat menjadi penghambat timbul penyakit. Dengan cara bakteri yang dihasilkan dari mangrove menghidrolisis gelatin dan menjadikan hidrolisat gelatin sebagai bahan untuk pembuatan obat (Sai-ut, 2013). Saat ini gelatinase diteliti sebagai target pengembangan obat karena potensinya yaitu berperan dalam degradasi jaringan ikat yang berhubungan dengan metastatis tumor (Pachecoet al., 1998).

2.2. Bakteri Gelatinolitik

Bakteri yang memiliki kemampuan merombak gelatin digolongkan sebagai bakteri gelatinolitik. Bakteri memiliki kemampuan untuk menghasilkan suatu zat yang spesifik dalam menguraikan suatu senyawa, yaitu enzim. Enzim berperan dalam kegiatan fisiologis salah satunya adalah pencernaan makanan ataupun perombakan zat makanan (volk dan wheeler, 1993).

Beberapa contoh genus bakteri gelatinolitik yaitu *Clostridium*, *Peptococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *vibrio*, *Moraxella*, *Microcoocus*, *Chromobacterium* (Dowell *et al.*, 1982).

2.3. Enzim

2.3.1. Definisi Enzim

Enzim adalah molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel (Richana, 2002). Menurut Soeka *et al.* (2011) Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan bekerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh.

2.3.2. Klasifikasi Enzim

Enzim dapat diklasifikasikan berdasarkan reaksi kimia yang dikatalisnya.

Klasifikasi ini dapat dilihat dari tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi Enzim

Enzim	Reaksi Katalis
Hidrolase	Dapat mengkatalis reaksi hidrolisis dari berbagai ikatan yang umumnya melibatkan perpindahan air. Contoh: esterase, nuklease, deaminase, amidase dan protease.
Isomerase	Dapat mengkatalis isomerase pada molekul yang mengakibatkan perubahan struktur molekul
Ligase	Dapat menggabungkan dua molekul menjadi ikatan kovalen
Oksidoreduktase	Mengkatalis reaksi oksidasi atau reduksi yang umumnya dapat melibatkan transfer elektron
Transferase	Mentransfer gugus fungsional (metil atau gugus fosfat). Contoh: transglikosidase, transmetilase, dan transasetilase.

Sumber: (Lehninger, 1982)

Menurut sifat katalik, enzim sebagai berikut: a) Enzim mampu meningkatkan laju reaksi pada kondisi biasa (fisiologis) dari tekanan, suhu dan pH. b) Enzim mempunyai selektifitas tinggi terhadap substrat (substansi yang mengalami perubahan kimia setelah bercampur dengan enzim) dan jenis reaksi yang dikatalisis, enzim memberikan peningkatan laju reaksi yang tinggi dibanding dengan katalis biasa (Page, 1989).

2.4. Sedimen

Sedimen adalah partikel organik dan anorganik yang terakumulasi secara bebas. Sedimen didefinisikan secara luas sebagai material yang diendapkan didasar suatu cairan, atau secara sempit sebagai material yang diendapkan oleh air, angin, atau gletser / es. Sedangkan endapan sedimen adalah akumulasi mineral dan fragmen batuan dari daratan yang bercampur dengan tulang-tulang organisme laut dan berupa partikel yang terbentuk melalui proses kimiawi yang terjadi didalam laut (Gross, 1993).

Menurut Friedman (1978), sedimen adalah kerak bumi yang ditransformasikan dari suatu tempat ke tempat lain baik secara vertikal maupun secara horizontal. Selanjutnya Ongkosongo (1992), menambahkan proses hidrologi tersebut akan terhenti pada suatu tempat dimana air tidak sanggup lagi membawa kerak bumi yang tersuspensi tersebut. Biasanya kawasan perairan tidak ada sedimen dasar yang hanya terdiri dari satu tipe substrat saja, melainkan terdiri dari kombinasi tiga fraksi yaitu pasir, lumpur, dan tanah liat.

2.5. Isolasi Mikroorganisme

Pada ekosistemnya, mikroorganisme hidup dan tumbuh bercampur dengan mikroorganisme lainnya dan hampir tidak ditemukan mikroorganisme yang hidup dan tumbuh tidak bercampur dengan mikroorganisme lainnya. Oleh karena itu perlu dilakukan isolasi pada mikroorganisme yang akan diteliti untuk memisahkan diri dari mikroorganisme lain. Kemudian ditumbuhkan menjadi biakan murni.

Hadioetomo (1990) menyebutkan bahwa terdapat tiga cara yang umum digunakan untuk mengisolasi mikroorganisme, antara lain :

1. Metode goresan (*streak plate method*)

Metode goresan merupakan metode isolasi dengan cara menggoreskan suspensi bahan yang mengandung 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.

2. Metode Sebaran (*spread plate method*)

Metode sebaran merupakan metode isolasi dengan cara menyebarkan sampel cair yang mengandung mikroorganisme pada permukaan media agar dalam petridish steril menggunakan *spreader* atau *hockey glass*. Setelah

inkubasi, pada permukaan media akan tumbuh koloni-koloni terpisah sehingga didapatkan biakan murni.

3. Metode Agar Tuang (*pour plate method*)

Metode agar tuang adalah metode dengan menginokulasikan suspensi bahan yang mengandung bakteri dalam petridish steril kemudian dituang 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 didapatkan bakteri murni.

Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan morfologi koloni yang bertujuan untuk mengidentifikasi suatu mikroorganisme. Dalam pengamatan tersebut, ada beberapa hal yang perlu diketahui, yaitu ukuran; pigmentasi; kondisi permukaan obyek, elevasi dan margin. Setelah pengamatan, kemudian dilakukan inokulasi. Isolasi mikroorganisme yaitu inokulasi yang merupakan suatu teknik pemindahan biakan tertentu dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tujuan untuk mendapatkan suatu biakan murni tanpa adanya kontaminasi dari mikroorganisme yang lain yang tidak diinginkan (Pelczar, 1986).

2.6. Identifikasi Mikroorganisme

Identifikasi suatu mikroorganisme dapat dilakukan dengan cara pewarnaan gram. Metode pewarnaan gram pada suatu mikroorganisme dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu gram positif dan gram negatif berdasarkan reaksi mikroorganisme terhadap cat yang diberikan. Reaksi tersebut ditentukan oleh komposisi dinding selnya (Nikaido, 1996).

Bakteri gram negatif lebih resisten terhadap obat-obatan dibandingkan dengan bakteri gram positif. Perbedaan klasifikasi antara kedua jenis bakteri tersebut adalah perbedaan struktur dinding sel bakteri. Pada bakteri gram positif susunan dinding sel lebih sederhana terdiri dari 2 lapisan namun memiliki lapisan

peptioglukan yang tebal. Sementara untuk bakteri gram negatif lebih kompleks dan terdiri dari 3 lapis namun lapisan peptioglukan tipis (Lay,1994).

Bakteri gram positif akan mempertahankan zat warna kristal violet sehingga akan tampak berwarna ungu tua dibawah mikroskop. Adapun bakteri gram negatif akan kehilangan zat warna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol, kemudian diberi zat tandingan yaitu safranin akan tampak berwarna merah. Perbedaan warna tersebut disebabkan oleh adanya perbedaan struktur kimiawi pada dinding selnya (Nofiani dan gusrizal, 2004).

Tahap identifikasi meliputi beberapa uji didasarkan Benson (1998). Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui genus bakteri yang berhasil diisolasi.

a. Morfologi Koloni Bakteri

Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bentuk, ukuran, tekstur, dan warna koloni bakteri dengan cara mencatat bentuk, ukuran, tekstur, dan warna sesuai acuan identifikasi.

b. Morfologi Bakteri

Pengamatan ini yaitu menggunakan pewarnaan gram, sel yang telah diwarnai akan dikatakan bersifat gram positif jika sel berwarna ungu atau violet dan bersifat gram negatif bila sel berwarna merah.

c. 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).

d. 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 menetes media SIM dengan Reagen Covacs. Uji indol dikatakan positif jika terbentuk cincin merah muda setelah ditetesi dengan Reagen Covacs dan jika terjadi perubahan warna maka dikatakan indol negatif. Cara kerjanya adalah isolat ditumbuhkan pada media yang mengandung triptofan dan menginkubasinya selama 48 jam pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan reagen yang mengandung paradimetil amonibenzal dehide.

e. Uji karakteristik Biokimia

Pengidentifikasian spesies mikroorganisme yaitu dengan cara menganalisis kemampuan metabolisme dengan menggunakan metode uji biokimia. Uji biokimia tersebut meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan bagian dari beberapa jenis sumber karbon dan senyawa lainnya yang dapat pada tubuhnya. Uji biokimia ini beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian dilakukan maka akan dapat menghasilkan identifikasi mikroorganisme secara spesifik hingga tingkat spesiesnya (Brock *et al.*, 1978).

- 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.
- 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°C . 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 CO_2 . Uji ini dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna merah jingga menjadi merah ungu (Ramdany, 2008).
- Uji arginin : uji ini digunakan untuk mengetahui reaksi apakah yang terjadi pada bakteri 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 37°C. selanjutnya ditambahkan reagen KOH 40% dan 15 tetes larutan alpha naphthol.
- Uji sitrat : uji ini digunakan untuk mengetahui apakah mikroorganisme mampu memfermentasikan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya yang ditandai dengan perubahan warna menjadi 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 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 biakan yang ditandai dengan pembentukan warna hitam pada media (Didje, *et al.* 2006). isolate bakteri digoreskan pada permukaan medium agar miring TSIA, dan juga ditusuk tegak lurus ditenga medium. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 65°C, uji positif ditandai adanya perubahan warna pada medium TSIA dari warna coklat tua menjadi oranye atau kuning. Terbentuknya H₂S dapat diamati dengan terbentuknya warna kehitaman pada bekas goresan, pembentukan

gas dapat diamati terbentuknya rongga pada bagian bawah agar (Arfah, *et al.* 2010).

- 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).

Prinsip kerja dari *microbact* adalah dengan mereaksikan sejumlah suspensi isolat kedalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis akan ditambahkan dan perubahan warna pada setiap sumur yang berada akan dicatat. Evaluasi hasil dapat dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tebal warna dan hasil akan ditulis pada formulir patient record. Angka-angka oktal yang telah didapat dari penjumlahan reaksi positif saja dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktaf). Nama bakteri akan dilihat dengan menggunakan komputer berdasarkan dengan angka oktaf yang telah didapatkan (Murtiningsih, 1997).