

PENGANTAR TEKNIK LABORATORIUM MIKROBIOLOGI DAN PENGENALAN BAKTERI ASAM LAKTAT

ISBN: 978-623-7911-89-0



Edy Fachrial, S.Si., M.Si
Harmileni, S.Si., M.Si
Sari Anggraini, S.Si., M.Si

PENGANTAR TEKNIK LABORATORIUM MIKROBIOLOGI DAN PENGENALAN BAKTERI ASAM LAKTAT

Penulis

Edy Fachrial, S.Si., M.Si

Harmileni, S.Si., M.Si

Sari Anggraini, S.Si., M.Si

Editor

Yonata Laia

Penerbit

UNPRI PRESS

ISBN: 978-623-7911-89-0

Redaksi

Jl. Sampul, Medan

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang
Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam
bentuk dan dengan cara apapun tanpa ijin dari penerbit

KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT karena atas rahmat-Nya lah penulis dapat menyelesaikan buku ini. Buku ini terdiri dari 7 BAB yaitu : BAB 1. BAKTERI DAN SEJARAH PENEMUANNYA, BAB 2. METODE ISOLASI BAKTERI DAN LABORATORIUM PENDUKUNG, BAB 3. TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI, BAB 4. ENZIM, BAB 5. BAKTERI ASAM LAKTAT, BAB 6. PREBIOTIK, BAB 7. BAKTERIOSIN. Buku ini cocok untuk dibaca oleh mahasiswa sains serta akademisi di bidang biologi dan biokimia. Semoga buku ini dapat bermanfaat dan berkontribusi bagi ilmu pengetahuan

Penulis, 24 November 2022

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI.....	ii
BAB 1	
BAKTERI DAN SEJARAH PENEMUANNYA	1
1.1 Sejarah Penemuan Mikroorganisme.....	1
1.2 Prevalensi Bakteri.....	4
1.3 Keragaman Bakteri	6
1.4 Metabolisme Bakteri	9
BAB 2	
METODE ISOLASI BAKTERI DAN LABORATORIUM	
PENDUKUNG.....	12
2.1 Media Pertumbuhan Bakteri.....	12
2.2 Teknik Isolasi Bakteri.....	16
2.3 Instrumen Pendukung Laboratorium Mikrobiologi	19
BAB 3	
TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI	27
3.1 Teknik Pewarnaan Dinding Sel (Pewarnaan Gram).....	27
3.2 Karakterisasi Biokimia	30
3.3 Identifikasi Molekuler	35
BAB 4	
ENZIM.....	39
4.1 Definisi Enzim.....	39
4.2 Sifat-Sifat dan Nomenklatur.....	40
4.3 Klasifikasi Enzim	43
BAB 5	
BAKTERI ASAM LAKTAT.....	49

5.1. Definisi dan Klasifikasi Bakteri Asam Laktat.....	49
5.2. Karakteristik Bakteri Asam Laktat.....	56
5.3 Sumber-Sumber Bakteri Asam Laktat.....	60
BAB 6	
PREBIOTIK.....	64
6.1 Definisi Prebiotik.....	64
6.2 Sumber Probiotik.....	64
6.3. Peran Probiotik Terhadap Pertumbuhan Probiotik.....	68
BAB 7	
BAKTERIOSIN	70
7.1 Klasifikasi Bakteriosin	70
7.2 Aplikasi Bakteriosin	72
Daftar Pustaka.....	78

BAB 1

BAKTERI DAN SEJARAH PENEMUANNYA

1.1 Sejarah Penemuan Mikroorganisme

Biologi atau ilmu hayat adalah ilmu yang mengkaji tentang kehidupan dan makhluk hidup, termasuk struktur, fungsi, pertumbuhan, evolusi, persebaran dan taksonominya. Ilmu ini sangat luas dan terdiri dari beberapa cabang dan subdisiplin. Biologi umumnya mengakui sel sebagai satuan dasar kehidupan, gen sebagai satuan dasar pewarisan, dan evolusi sebagai mekanisme yang mendorong terciptanya spesies baru. Selain itu, organisme diyakini bertahan dengan mengonsumsi, dan mengubah energi serta dengan meregulasi keadaan dalamnya agar tetap stabil, dan vital.

Salah satu cabang ilmu Biologi adalah mikrobiologi. Seperti namanya, dalam mikrobiologi yang dipelajari adalah makhluk hidup namun yang berukuran sangat kecil sehingga harus dilihat menggunakan alat khusus. Makhluk ini bisa saja berupa bakteri, virus, jamur, alga, dan lain sebagainya. Secara etimologi, kata mikrobiologi berasal dari bahasa Yunani, yaitu kata “mikros” berarti kecil dan “bios” artinya hidup, serta “logos” artinya ilmu. Sehingga mikrobiologi dapat didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari mengenai makhluk hidup berukuran kecil yang tidak bisa dilihat secara kasat mata biasa namun membutuhkan suatu benda untuk bisa melihatnya, yang kita kenal sebagai mikroskop dengan mencakup bakteri, virus dan jamur. Manusia mulai tertarik mempelajari mikrobiologi setelah ada penyakit yang menyerang tubuh manusia dan diketahui ada mikroorganisme yang menyebabkan penyakit tersebut. Berdasarkan sejarahnya, perkembangan mikrobiologi dibedakan dalam beberapa periode. Pada awalnya, ilmu mikrobiologi berkembang karena terbukanya ilmu pengetahuan mengenai

mikroorganisme melewati pengamatan yang dilakukan oleh Antonie Van Leeuwenhoek di tahun 1675. Dalam sejarah, Antoine van Leeuwenhoek adalah ilmuwan yang pertama kali menemukan mikroorganisme.



Gambar 1. Antonie Van Leeuwenhoek
(pixabay.com)

Sepanjang hidupnya, Leeuwenhoek telah merancang lebih dari 200 jenis mikroskop. Dia menggunakan mikroskop primitif untuk menganalisa sejumlah organisme, dan sejarah juga mencatat dia adalah ilmuwan pertama yang mengamati kapiler darah pada beberapa spesies dan pergerakan darah didalamnya.

Di dalam kapiler, dia mendeteksi sel darah merah dan menggambarkan ukuran serta bentuknya. Leeuwenhoek juga mempelajari serat otot, yang menjadi pionir dalam teknik pewarnaan otot dengan pewarna untuk membuat

detil jaringan dan struktur otot menjadi jelas. Penemuan terbesar Leuwenhoeek adalah penemuan mikroorganisme, suatu makhluk hidup mikroskopik yang terdiri dari sel tunggal. Laporan mengenai mikroorganisme oleh Leeuwenhoek menimbulkan mengenai asal usul mikroorganisme yang dilihatnya.

Kemajuan pesat dalam dunia mikrobiologi pada abad ke sembilan belas dan awal abad ke duapuluh dimulai dengan munculnya empat pertanyaan ilmiah yaitu : (1) apakah kehidupan bermula dari benda mati, (2) apakah mikroorganisme dapat menyebabkan penyakit infeksius, (3) bagaimana diversitas mikroba di bumi, (4) apakah mikroba tanah dan air memiliki sifat yang menguntungkan. Pertanyaan ini dijawab melalui serangkaian penelitian oleh “empat raksasa” dalam dunia mikrobiologi : ahli kimia Perancis Louis Pasteur (1822-1895), ahli fisika Jerman Robert Koch (1843-1910), ahli mikrobiologi Belanda Martinus Beijerinck (1851-1931) dan ahli mikrobiologi Rusia Sergei Winogradsky (1856-1953).

Pasteur melakukan penelitian mengenai mekanisme fermentasi alkohol yang mana pada pertengahan abad ke sembilan belas diasumsikan sebagai suatu reaksi kimiawi. Melalui pengamatan mikroskopik dan berbagai eksperimen, Pasteur menunjukkan bahwa fermentasi sebenarnya disebabkan oleh aktivitas metabolisme sel yeast. Pasteur kemudian menggunakan hasil percobaan ini untuk mendesain berbagai eksperimen untuk membuktikan kesalahan “teori generasi spontan” yang menyatakan bahwa organisme hidup dapat muncul dari benda mati. Pasteur menunjukkan bahwa jika suatu larutan nutrient di sterilkan dari semua mikroorganisme (pada umumnya dengan cara dipanaskan) dan dilindungi dari kontaminasi udara, maka larutan tersebut akan tetap steril hingga di paparkan dengan mikroorganisme.

Salah satu alasan Louis Pasteur membuktikan kekeliruan *generatio spontanea* didasarkan pada keyakinannya bahwa produk fermentasi buah anggur (minuman beralkohol) merupakan hasil kerja mikroorganisme, bukan sebaliknya, fermentasi menghasilkan mikroorganisme. Sari buah anggur digunakan oleh mikroorganisme untuk melakukan serangkaian proses metabolisme, yang menghasilkan senyawa yang memberikan rasa dan aroma baru sehingga menjadi minuman anggur. Proses yang dilakukan mikroorganisme disebut dengan fermentasi.

Pada tahun 1950, Pasteur diminta membantu industri anggur Perancis, yang memiliki masalah kualitas minuman anggur yang tidak sama. Menurut Pasteur, beberapa mikroorganisme dapat terlibat dalam pembuatan anggur yang kadang-kadang menghasilkan asam laktat, bukan etanol. Adanya asam laktat dalam minuman anggur menurunkan kualitas produksi. Untuk mengatasinya, Pasteur memanaskan sari buah anggur dengan suhu 50 – 60°C dengan tujuan membunuh mikroorganisme yang tidak dikehendaki. Setelah itu baru ditambahkan minuman anggur yang mengandung mikroorganisme tertentu, sehingga kualitas minuman anggur menjadi terjaga. Proses pemanasan serupa digunakan oleh industri makanan modern sekarang ini, dan dikenal dengan pasteurisasi. Teknik pengendalian mikroorganisme lainnya baik pada bahan maupun proses tertentu berkembang terus dan dikenal dengan sterilisasi.

1.2 Prevalensi Bakteri

Terdapat hanya dua jenis organisme di Bumi, yaitu prokariotik dan eukaryotik. Eukaryotik adalah sel yang memiliki nukleus (inti sel) dan memiliki selaput inti sedangkan prokaryotik tidak memiliki inti. Tipikal sel prokaryotik adalah hanya berukuran beberapa mikrometer saja, memiliki struktur sel yang sederhana yang terdiri dari sitoplasma, ribosom, membran

plasma dan dinding sel. Sel eukaryotik memiliki ukuran hingga 10.000 kali lebih besar daripada sel prokaryotik, memiliki nukleus serta struktur sel yang lengkap seperti retikulum endoplasma, badan golgi, peroksisom, lisosom, endosome, vakuola, serta beberapa memiliki kloroplast. Sel eukaryotik juga memiliki berbagai tipe sitoskeletal seperti sentriol, mikrotubula dan mikrofilamen (Yamaguchi et al., 2012).

Bakteri adalah bentuk kehidupan yang paling tua, paling sederhana dan paling berlimpah di muka bumi. Bakteri adalah satu-satunya organisme yang tergolong prokaryotik. Dalam suatu penelitian dilaporkan bahwa bakteri berhasil diisolasi dari batuan yang berusia 3,8 milyar tahun, dan diperkirakan bakteri telah ada 2 milyar sebelum eukaryotik ada di muka bumi. Bakteria fotosintetik atau dikenal sebagai "*cyanobacteria*" adalah bakteri yang pertama kali menghasilkan oksigen di permukaan bumi sebelum tanaman ber klorofil. Bakteri memegang peranan penting dalam produktivitas dan siklus senyawa-senyawa penting bagi makhluk hidup, dan hanya bakteri satu-satunya organisme yang mampu memperbaiki nitrogen atmosfer.

Sekitar 5000 jenis bakteri telah berhasil diidentifikasi saat ini, dan diperkirakan masih ada ribuan lagi yang belum diidentifikasi. Terkadang dari hasil riset dan penemuan-penemuan terkait mikrobiologi, beberapa penemuan merubah cara kita berpikir mengenai bakteri. Pada tahun 1970-an dan 80-an, jenis baru bakteri berhasil dianalisa dan menambah klasifikasi baru dari sel prokaryotik, yaitu penemuan archaeobacteria (atau *Archaea*). Bahkan meskipun dilihat menggunakan mikroskop elektrom, perbedaan structural antara bakteri satu dengan yang lain bersifat minor. Bakteri hanya bisa dikarakterisasi hanya ketika bakteri tersebut tumbuh pada suatu media pertumbuhan dikareakan karakteristik organisme ini seringkali berubah, tergantung dari kondisi pertumbuhannya.

Keberadaan bakteri sangat berlimpah di permukaan Bumi, dan hidup dimana saja. Beberapa jenis bakteri bahkan hidup pada kondisi lingkungan ekstrim dimana makhluk hidup lain tidak dapat hidup di sana, misalnya hidup pada sumber air panas yang bisa “memasak” organisme lain, lingkungan *hypersaline* (kadar garam tinggi) yang bisa menimbulkan dehidrasi pada organisme lain dan pada atmosfer yang kaya akan gas beracun seperti metana atau hydrogen sulfide yang dapat membunuh makhluk hidup lain. Kondisi “keras” seperti ini kemungkinan mirip dengan kondisi pada awal Bumi terbentuk, dimana kehidupan baru mulai muncul. Bakteri jenis ini akan dibahas di sub bab berikutnya dalam buku ini (Al-mohanna, 2017).

1.3 Keragaman Bakteri

Bakteri tidak diklasifikasikan berdasarkan bentuknya saja, tetapi lebih berdasarkan karakteristik biokimia dan karakteristik metabolisme. Karakteristik bakteri yang digunakan untuk klasifikasi meliputi

1. Fotosintetik atau non fotosintetik
2. Motil atau non motil
3. Uniselular atau multiselular
4. Pembentukan spora atau non spora

Meskipun bakteri tidak mempunyai struktur yang kompleks seperti eukaryotik, bakteri mempunyai metabolisme dan fungsi yang unik. Bakteri memiliki kemampuan untuk beradaptasi di lingkungan yang ekstrim. Bakteri dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan air dengan kadar garam tinggi, lingkungan yang sangat asam atau basa, dan pada lingkungan panas atau dingin. Bakteri dapat ditemukan pada sumber air panas dimana suhu melebihi 78°C dan bahkan ditemukan pada kedalaman 435 m di lapisan es antartika.

Secara garis besar, bakteri dibagi menjadi dua domain. Salah satunya adalah “*Archaea*”, yang terdiri dari *archaebacteria* (bakteri kuno). Jenis bakteri ini merupakan bakteri yang bertahan hidup pada kondisi ekstrim dan kemungkinan telah menempati pada awal pembentukan Bumi. Meskipun begitu, hasil skrining genetik membuktikan bahwa bakteri kuno ini juga dapat ditemukan pada kondisi non ekstrim. Domain yang lain adalah “*Bacteria*”, yang terdiri dari *eubacteria* (bakteri sejati). Jika dibandingkan antara *archaebacteria* dengan *eubacteria*, keduanya memiliki beberapa kesamaan dan juga perbedaan. Kedua domain ini tergolong prokaryotik, tetapi terdapat perbedaan pada tingkatan biokimia dan molekuler. Terdapat empat poin perbedaan yaitu :

1. Dinding sel. Kedua jenis bakteri ini memiliki dinding sel yang menutupi membrane plasma dan memperkuat sel. Dinding sel pada *eubacteria* terdiri dari kompleks protein-karbohidrat yang disebut peptidoglikam, yang berikatan satu sama lain membentuk jaring-jaring kuat dan memberikan *eubakteri* dinding sel yang kuat, sementara pada dinding sel *archaebacteria* sedikit mengandung peptidoglikan
2. Membran plasma. Semua bakteri memiliki membran plasma dengan arsitektur berbentuk lipid-bilayer. Membran plasma *eubacteria* dan *archaebacteria* memiliki struktur lipid yang berbeda
3. Organel translasi gen. *Eubacteria* memiliki protein ribosomal dan RNA polymerase yang sangat berbeda dengan eukaryotik. Meskipun demikian, protein ribosomal dan RNA *archaebacteria* sangat mirip dengan eukaryotik.
4. Arsitektur gen. Gen pada *eubacteria* tidak memiliki intron, sementara pada beberapa gen di *archaebacteria* memiliki intron.

Bakteri dapat bereproduksi dengan cepat, menyebabkan variasi genetic menyebar dengan cepat di populasinya. Terdapat dua proses yang menyebabkan variasi diantara bakteri yaitu mutasi dan rekombinasi genetik.

Istilah mutasi pertama kali digunakan untuk mengindikasikan perubahan herediter, oleh botanis Belanda dan ahli biologi evolusioner, Hugo De Vries (1848-1935), pada tahun 1886. De Vries berpendapat bahwa teori evolusi dan seleksi alam yang dikemukakan oleh Charles Darwin (1809-1882) dan Alfred Russel Wallace (1823-1913) pada tahun 1858, tidak dapat menghasilkan spesies baru, bahkan pada jangka waktu yang lama. Dia mengemukakan bahwa ada partikel diskrit yang diturunkan yang dinamakan “pangenes”, yang dapat berubah secara instan menghasilkan spesies yang baru. (Johnston, 2006).

Mutasi dapat terjadi secara spontan di bakteri dikarenakan kesalahan dalam replikasi DNA. Beberapa faktor yang menyebabkan tingginya kesalahan replikasi tersebut adalah radiasi, sinar ultraviolet dan berbagai macam bahan kimia. Pada bakteri pada umumnya seperti *Escherichia coli*, terdapat sekitar 5000 gen. Diperkirakan bahwa satu mutasi terjadi pada setiap 1 juta copy gen. Dengan adanya 5000 gen pada bakteri, hukum probabilitas memprediksi bahwa 1 dari 200 bakteri akan mengalami mutasi. 1 sendok penuh tanah diperkirakan mengandung lebih dari 1 milyar bakteri sehingga kemungkinan terdapat lebih dari 5 juta bakteri mutant. Dengan nutrisi yang cukup, populasi *E.coli* dapat berlipat ganda kurang dari 20 menit. Karena bakteri berlipat ganda dengan sangat cepat, mutasi dapat menyebar dengan cepat pada populasi dan dapat merubah karakteristik populasi tersebut. Kemampuan bakteri untuk bermutasi dengan cepat seringkali menimbulkan dampak negatif terhadap manusia. Pada suatu kasus dilaporkan bahwa suatu strain *Staphylococcus aureus* berhubungan dengan

kejadian infeksi serius pada pasien yang dirawat dirumah sakit, dan ternyata pada diketahui bahwa beberapa strain *Staphylococcus* tersebut telah resisten terhadap penicillin dan berbagai antibiotik lainnya, menyebabkan infeksi sulit untuk disembuhkan.

Sumber variasi genetik yang lain dalam populasi bakteri adalah rekombinasi. Rekombinasi, merupakan pertukaran DNA antara kromosom maternal dan paternal yang terjadi selama meiosis (Stapley et al., 2017). Rekombinasi bakteri terjadi melalui transfer gen dari satu sel ke sel yang lain dengan bantuan virus, atau melalui konjugasi. Transfer gen resisten antibiotik yang terjadi dengan cepat melalui plasmid merupakan penyebab terjadinya strain *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik. Contoh yang lain yang berhubungan dengan saluran pencernaan manusia adalah Enterobacteriaceae, yang termasuk bakteri umum yang terdapat pada usus, sama seperti *Escherichia coli*. Dalam kelompok bakteri ini, terdapat banyak bakteri pathogen, termasuk bakteri yang menyebabkan penyakit disentri, tifoid dan penyakit yang lain. Saat ini diketahui bahwa beberapa materi genetik dari spesies pathogen ini ditransfer ke *E.coli* melalui plasmid. Dikarenakan jumlah *E.coli* yang banyak pada saluran pencernaan manusia, maka *E.coli* bisa menjadi ancaman kesehatan yang serius jika mengalami transfer genetik sejenis ini.

1.4 Metabolisme Bakteri

Bakteri telah mengembangkan banyak mekanisme untuk memperoleh energi dan nutrient yang mereka butuhkan untuk tumbuh dan reproduksi. Sebagian besar bakteri adalah autotroph, yaitu organisme yang memperoleh sumber karbon dari sumber anorganik yaitu CO₂. Autotrof memperoleh energi dari sinar matahari yang disebut fotoautotrof, sementara yang memperoleh energi dari senyawa kimia anorganik disebut kemoautotrof.

Sebagian bakteri yang lain bersifat heterotrof, yaitu organisme yang memperoleh sumber karbon dari molekul organik seperti glukosa. Organisme heterotroph yang memperoleh energi dari sinar matahari disebut fotoheterotrof, sementara yang memperoleh energi dari molekul organik disebut kemoheterotrof.

Cyanobacteria adalah salah satu contoh bakteri fotoautotrof. Seperti yang dijelaskan pada sub bab sebelumnya, *Cyanobacteria* adalah mikroorganisme penghasil oksigen pertama kali di bumi sebelum tumbuhan hijau. *Cyanobacteria* juga dikenal sebagai ganggang hijau biru, adalah organisme fotosintetik tertua yang telah ada sejak 2,6 -3,5 milyar tahun yang lalu. Bakteri ini banyak ditemukan diberbagai daerah perairan dari air laut, sungai, danau dan perairan lainnya. Bakteri ini menggunakan klorofil a sebagai pigment penangkap cahaya dan menggunakan H₂O sebagai donor electron,melepaskan oksigen sebagai produk samping. Bakteri yang lain menggunakan bakterioklorofil sebagai pigmen dan H₂S sebagai donor elektron, serta melepaskan belerang sebagai produk samping (Lau et al., 2015).

Kebanyakan prokaryot yang terlibat dalam proses reoksidasi adalah kemoautotrof, yang menggunakan energi dari reaksi anorganik. Mikroorganisme *chemoautotroph* memegang peranan penting dalam ekosistem laut terutama ventilasi hidrotermal. Beberapa bakteri memperoleh energinya dari mengoksidasi senyawa anorganik. Sebagai contoh adalah Nitrifiers, yang mengoksidasi ammonia atau nitrit untuk memperoleh energi, menghasilkan nitrat yang digunakan oleh tanaman. Proses ini disebut fiksasi nitrogen dan proses ini sangat penting dalam ekosistem daratan karena tanaman hanya bisa menyerap nitrogen dalam bentuk nitrat. Bakteri yang

lain mengoksidasi belerang, gas hidrogen dan molekul anorganik yang lain (Boschker et al., 2014)

Fotoheterotrof adalah mikroorganisme yang menggunakan cahaya sebagai energi, tetapi tidak bisa menggunakan CO₂ sebagai sumber karbon. Bakteri ini menggunakan senyawa organik dari lingkungan untuk memenuhi kebutuhan karbon mereka, sehingga mereka menggunakan senyawa organik dari lingkungan untuk memenuhi kebutuhan karbon, senyawa ini termasuk karbohidrat, lemak dan alkohol. Contoh dari organisme heterotroph adalah bakteri ungu non-sulfur, bakteri hijau non-sulfur, dan heliobacteria. Kemoheterotrof adalah organisme yang memperoleh energi dengan oksidasi dari donor electron dalam lingkungannya. Molekul ini dapat bersifat organik (kemoorganoheterotrof), yang menggunakan sumber electron organik seperti karbohidrat, lipid dan protein atau anorganik (kemolitoheterotrof) yang menggunakan sumber elektron anorganik seperti belerang (Campbell et al., 2008).

BAB 2

METODE ISOLASI BAKTERI DAN LABORATORIUM PENDUKUNG

2.1 Media Pertumbuhan Bakteri

Media merupakan suatu hahan yang terdiri atas campuran nutrisi yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme baik dalam mengkultur bakteri, jamur dan mikroorganisme lain. Suatu media dapat menumbuhkan mikroorganisme dengan baik bila memenuhi persyaratan antara lain kelembapan yang cukup, pH yang sesuai, kadar oksigen cukup, media steril, serta harus mengandung semua nutrisi yang mudah digunakan mikroorganisme. Unsur-unsur yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhan meliputi karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg dan Fe, vitamin, air, dan energi.

Untuk dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroba yang diharapkan, media harus memenuhi persyaratan sebagai berikut :

1. Susunan nutrisi

Unsur-unsur yang diperlukan dalam media meliputi air, sumber karbon, sumber nitrogen, sumber mineral, vitamin dan gas. Bakteri peka terhadap kekeringan sehingga perlu air yang cukup untuk menjaga kondisi tetap lembab. Untuk sumber karbon dapat digunakan senyawa karbon sederhana seperti CO₂, CH₄ atau senyawa karbon kompleks seperti gula (missal : glukosa, laktosa, sukrosa, dan lain sebagainya). Senyawa nitrogen dapat berasal dari senyawa nitrogen sederhana seperti NH₃ atau nitrogen yang lebih kompleks seperti pepton dan asam amino. Mineral yang sering dibutuhkan dalam media adalah K, Mg, Na, Zn, P, S dan Cl.

Beberapa bakteri membutuhkan vitamin K (missal : *Bacteroides melanogenicus*) dan juga gas (missal : *Gonococcus* yang membutuhkan CO₂), namun ada juga bakteri yang justru mati jika ada oksigen (bakteri anaerob)

2. Temperatur

Bakteri agar dapat tumbuh optimal membutuhkan suhu tertentu. Umumnya bakteri pathogen membutuhkan suhu sekitar 37C sesuai dengan suhu tubuh manusia walaupun ada juga bakteru yang membutuhkan suhu tinggi seperti *Camphylobacter* (42°C).

3. Tekanan Osmosis

Secara umum untuk pertumbuhannya, bakteri membutuhkan media isotonic. Apabila media bersifat hipotonis, maka bakteri akan mengalami plasmoptysis dan apabila bersifat hipertonic, bakteri akan mengalami plasmolysis.

4. Derajat keasaman (pH)

Sebagian besar bakteri membutuhkan pH sekitar netral. Namun beberapa bakteri butuh perlakuan khusus sebagai contoh bakteru *Vibrio*, yang membutuhkan pH alkali sekitar 8-10 untuk dapat tumbuh optimal.

5. Sterilitas

Sterilitas merupakan hal yang mutlak dibutuhkan untuk melakukan pemeriksaan mikrobiologi. Jika media yang digunakan tidak steril maka tidak dapat dibedakan apakah yang tumbuh merupakan bakteri yang dibutuhkan atau hanya merupakan bakteri kontaminan (Rachmawaty, 2020).

Adapun jenis media pertumbuhan dapat berupa media cair, media padat dan semi padat (Juriah & Sari, 2018).

1. Media cair digunakan untuk pembenihan diperkaya (*enrichment*) sebelum disebar ke media padat. Media ini tidak dapat dipakai untuk mempelajari koloni kuman. Contoh media cair adalah *Nutrient Broth* (NB), *Pepton Dilution Fluid* (PDF), *Lactose Broth* (LB), *Mac Conkey Broth* (MCB) dan lain-lain. Media cair dibuat dengan cara melarutkan sejumlah media kedalam aquadest berdasarkan petunjuk yang terdapat dilabel, dan dilanjutkan dengan sterilisasi.
2. Media semi padat adalah media cair yang ditambahkan dengan agar 0,5%
3. Media padat mengandung komposisi agar sebesar 15%. Media padat digunakan untuk mempelajari koloni bakteri, untuk mengisolasi dan juga untuk memurnikan bakteri. Contoh media padat adalah media *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Plate Count Agar* (PCA) dan lain-lain

Media juga dapat dikelompokkan berdasarkan kegunaan atau tujuan, meliputi media untuk pembiakan secara umum, media yang diperkaya, media selektif, media pembiakan diferensiasi serta media kombinasi selektif dan diferensiasi. Penjabaran media tersebut sebagai berikut :

1. Media umum

Media umum merupakan media padat yang mengandung bahan-bahan semi alamiah, digunakan untuk pembiakan secara umum mengandung unsur-unsur untuk pertumbuhan mikroorganisme secara umum tanpa mengandung unsur penghambat tertentu. Dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri dan jamur

2. Media transport

Media transport adalah media yang digunakan untuk membawa specimen dari suatu tempat ke tempat yang lain agar mikroba yang ada di dalamnya yang akan dianalisa, tetap terjaga kehidupannya sehingga memudahkan untuk mendiagnosis atau untuk keperluan lain. Macam-

macam media transport diantaranya Stuart, Amies, Carry and Blair, alkali pepton dan lain-lain. Penggunaan masing-masing media adalah sebagai berikut :

1. Media stuart merupakan media yang digunakan untuk media transport terutama kuman perut (Gram negatif). Misalnya specimen yang berasal dari feses.
 2. Media Amies merupakan modifikasi dari media Stuart, dapat digunakan untuk specimen dari sekret atau luka, ideal untuk membawa spesimen yang diduga mengandung gonorrhea
 3. Media Carry and Blair merupakan media dengan konsistensi semi solid, memiliki pH $7,2 \pm 0,2$ dengan standar pembuatan media, merupakan media transport umum
 4. Media alkali pepton digunakan untuk membawa spesimen yang diduga mengandung bakteri vibrio
3. Media diperkaya
- Media diperkaya/media kaya adalah media yang ditambahkan zat-zat organik yang diperoleh dari makhluk hidup misal darah, telur dan lain-lain. Media ini dipergunakan untuk pertumbuhan bakteri yang tidak dapat tumbuh pada media sederhana misal *Gonococcus*, *Streptococcus*, dan *Pneumococcus*
4. Media selektif
- Media pembiakan selektif mendukung pertumbuhan mikroorganisme jenis tertentu dan menghambat pertumbuhan flora campuran lain. Selektifitas ini diperoleh dengan menambahkan bahan kimia, pewarna atau antibiotik pada media. Contoh media ini adalah
- a. Group A selective strep Agar dengan 5% darah domba
 - b. Media *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS) merupakan media selektif untuk bakteri *Vibrio cholera*

c. Media Salmonella & Shigella Agar (SSA), media ini digunakan untuk menyeleksi bakteri Salmonella dan Shigella

5. Media diferensial

Sedangkan media diferensial adalah media yang mengandung unsur yang memungkinkan untuk mengidentifikasi mikroorganisme jenis tertentu dari kultur murni atau campuran. Identifikasi ini biasanya berdasarkan penampakan dari mikroorganisme, seperti warna koloni atau adanya presipitat. Contoh media ini adalah

1. Media Mac Conkey : pada media ini dapat dibedakan bakteri yang memfermentasikan laktosa dan yang tidak memfermentasikan laktosa
2. Media Klinger Iron Agar (KIA) : pada media ini dapat diketahui bakteri yang memfermentasikan laktosa dan glukosa serta pembentukan H₂S
3. Triple Sugar Iron Agar (TSIA) yang digunakan untuk mengidentifikasi organisme intestinal Gram negatif berdasarkan kemampuannya untuk memfermentasikan dekstrosa, laktosa, sukrosa serta menghasilkan sulfide.

6. Media kombinasi

Media jenis ini dapat berupa media yang tidak dapat diperkaya, seperti Trypticase Soy Agar, maupun media yang diperkaya misalnya Trypticase Soy Agar dengan 5% darah domba (Rachmawaty, 2020).

2.2 Teknik Isolasi Bakteri

Teknik isolasi atau penanaman mikroba untuk menanam suatu mikroba perlu diperhatikan faktor-faktor nutrisi serta kebutuhan akan oksigen. Cara menumbuhkan mikroba yang anaerob berbeda dengan yang aerob. Mengisolasi suatu mikroba ialah memisahkan mikroba tersebut dari

lingkungannya di alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam media pertumbuhan. Sebelum melakukan isolasi, tentunya peneliti harus memahami syarat-syarat pertumbuhan dan cara-cara menanamnya, serta bagaimana cara memurnikannya. Di alam mikroba jarang sekali ditemui dalam keadaan murni, pada umumnya merupakan campuran bermacam-macam spesies mikroba. Macam-macam cara mengisolasi dan menanam mikroba adalah (Lusi & Solikah, 2019) :

1. Spread plate method (teknik sebar/tebar)

Metode spread plate ialah metode isolasi mikroba dengan metode menginokulasi kultur mikroba secara pulsan/ sebaran di permukaan media supaya yang sudah memadat. Metode ini dilakukan dengan mengencerkan biakan kultur mikroba. Karena konsentrasi sel- sel mikroba pada umumnya tidak diketahui, sehingga pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap, sehingga sekurang- kurangnya terdapat satu dari pengenceran itu yang memiliki koloni terpisah(30- 300 koloni). Koloni mikrobial yang terpisah memungkinkan koloni tersebut bisa dihitung.



Gambar 2. Pertumbuhan mikroga di media agar (<https://pexels.com/>)

2. Pour plate method (Tabur)

Dasar dari metode ini yaitu 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.

3. Streak Plate Method (Gores)

Metode gores umumnya digunakan mengisolasi koloni mikroba pada cawan agar sehingga didapatkan koloni terpisah dan merupakan biakan murni. Dasar metode ini yaitu dengan 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. 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

2.3 Instrumen Pendukung Laboratorium Mikrobiologi

Laboratorium mikrobiologi adalah laboratorium yang didesain secara khusus untuk keperluan praktikum atau eksperimen yang berhubungan dengan mikrobiologi. Laboratorium mikrobiologi harus mempunyai sejumlah alat yang dapat menunjang proses praktikum dan penelitian didalamnya. Diantara alat-alat tersebut, ada alat-alat yang khusus digunakan di dalam Mikrobiologi dan ada juga yang tidak. Untuk menunjang kesuksesan praktikum maupun eksperimen maka diperlukan peralatan khusus di laboratorium Mikrobiologi. Dibawah ini ada beberapa peralatan mikrobiologi yang umum dan fungsi dari alat-alat tersebut (Anonymous, 2019)

1. Autoklaf

Kata autoclave jika dilihat dari sudut pandang bahasa merupakan serapan dari bahasa asing. Di Indonesia itu sendiri banyak yang menyebutnya autoklaf atau otoklaf. Autoklaf terdiri dari 2 kata, yakni : auto berasal dari bahasa Yunani yang berarti diri, dan *clavis* dari bahasa latin yang berarti kunci. Auto-clavis mungkin bisa diartikan secara sederhana mengunci diri, alat pengunci diri, atau ruang kedap yang terkunci dan tertutup rapat. Autoclave di laboratorium mikrobiologi digunakan untuk

mensterilisasi suatu benda ataupun media dengan menggunakan uap bersuhu dan bertekanan tinggi (121°C, 15 lbs). Waktu sterilisasi adalah sekitar 15 menit dihitung setelah suhu autoclave mencapai 121°C. Beberapa alat bahan yang sering disterilisasi dengan autoclave adalah media pertumbuhan bakteri, bahan kimia yang tidak mudah terbakar. Autoclave adalah sebuah alat laboratorium yang digunakan untuk mensterilkan alat-alat laboratorium setelah digunakan. Kenapa alat laboratorium perlu di sterilisasi? Jawabnya karena alat tersebut masih bisa digunakan kembali, bukan tipe sekali pakai dan langsung buang. Sterilisasi itu sendiri merupakan proses yang dilakukan untuk membunuh atau menghilangkan mikroorganisme, virus, bakteri, spora, dan fungi beserta sporanya pada alat laboratorium atau media lainnya (baik padat maupun cair). Proses sterilisasi itu sendiri memiliki banyak jenisnya, seperti : filtrasi, pemanasan, energi suara dan penyinaran. Proses sterilisasi dengan menggunakan autoclave dapat dikatakan salah satu yang terbaik karena menggunakan proses pemanasan dengan suhu yang dibuat periodik dalam satuan waktu tertentu.

2. Oven

Oven adalah alat pemanas tertutup yang bisa diatur suhunya dan untuk jenis oven terkini dapat diatur timer-nya (waktu menyala). Ada bermacam-macam oven antara lain oven manual dan oven listrik. Oven manual biasanya sumber panasnya dengan memanfaatkan sumber air seperti kompor atau sumber yang lain, sedangkan oven listrik adalah oven yang sumber panasnya dihasilkan dari proses perubahan energi listrik menjadi energi panas dengan menggunakan alat yang bernama elemen listrik. Fungsi oven di laboratorium mikrobiologi biasanya

digunakan sebagai alat sterilisasi dengan menggunakan panas kering, dengan suhu sekitar 180°C.

3. Cawan petri

Cawan petri merupakan alat gelas laboratorium yang berbentuk lingkaran silindris dan digunakan pada laboratorium untuk mengembangbiakkan mikroorganisme dan sel. Untuk mempelajari dan meneliti mikroorganisme bakteri dan virus, sangat penting untuk menjaga bakteri dan virus tersebut dari spesi atau elemen lain yang dapat mengkontaminasinya. Cawan petri pertama kali ditemukan oleh peneliti bakteriologis dari Jerman yang bernama Julius Richard Petri. Oleh karena itu dia menamai cawan ini dengan nama akhirnya yakni cawan petri. Cawan petri mayoritas digunakan sebagai peralatan di laboratorium kimia dan biologi. Alat ini biasa digunakan untuk menumbuhkan sel dengan menyediakan ruang penyimpanan yang luas dan mencegahnya untuk terkontaminasi dengan bahan lain.

Dengan warna cawan yang transparan akan memudahkan peneliti untuk melihat dan mengamati fase pertumbuhan dari mikroorganisme secara jelas. Ukuran dari cawan petri juga memungkinkannya untuk diamati menggunakan mikroskop secara langsung tanpa perlu memindahkan sampel ke plat mikroskopik. Selain penggunaannya untuk menumbuhkan mikroorganisme, cawan petri juga banyak digunakan sebagai tempat penyimpanan berbagai jenis bahan kimia dalam kehidupan sehari-hari. Hal itu karena bentuk cawan petri yang mendukung sebagai tempat penyimpanan. Dalam fungsi ini cawan petri dapat ditutup dengan penutupnya yakni cawan petri yang berukuran lebih besar, atau dapat juga menggunakan kaca arloji ataupun aluminium foil sebagai penutupnya.

4. Batang Ose

Batang ose merupakan alat yang digunakan untuk melakukan inokulasi. Bentuk batang ose mirip dengan batang pengaduk hanya saja dibagian ujung terdapat kawat dan ada yang berbentuk kolongan ada juga yang lurus. Bentuk kawat pada ujung ose mempunyai kegunaan yang sedikit berbeda. Pada batang ose ujung kolongan biasanya digunakan untuk inokulasi pada media cair sedangkan ose yang berbentuk lurus biasanya digunakan pada inokulasi dengan cara metode gores pada media agar.

5. Tabung Reaksi dan Tabung Durham

Tabung reaksi di Laboratorium mikrobiologi biasanya digunakan sebagai tempat pengenceran atau digunakan tempat menyimpan media. Sedangkan tabung durham adalah alat bantu yang digunakan sebagai indikator pada pengujian mikrobiologi dengan metode MPN. Bentuk tabung durham sama dengan tabung reaksi akan tetapi ukuran tabung reaksi lebih kecil dibandingkan dengan tabung reaksi, silahkan lihat gambar disamping. Cara penggunaan tabung reaksi adalah dengan menempatkan Tabung durham pada tabung reaksi dengan posisi terbaik. Tabung durham sebagai alat bantu indikator adanya fermentasi. Jika tabung durham terdapat gelembung menandakan adanya fermentasi. Alat ini biasa dipakai pada pengujian mikroba dengan metode MPN (Most Probable Number).

6. Pengaduk L (spreader)

Berfungsi untuk meratakan sampel yang dimasukkan kedalam media yang ada di cawan petridish dengan cara diputar

7. Lampu Spirtus/Bunsen

Lampu spirtus adalah lampu pemanas api dengan bahan bakar dari spirtus. Pada laboratorium mikrobiologi lampu spirtus mempunyai beberapa fungsi / kegunaan, yaitu sterilisasi (memijarkan ose) sebelum

inokulasi sample dan mengkondisikan area dalam kondisi aseptis dengan jarak max dari pijaran lampu spirtus 30 cm.

8. Inkubator

Inkubator adalah alat yang digunakan untuk menginkubasi suatu biakan. Inkubator menyediakan kondisi temperatur yang optimum untuk mikroorganisme bisa melakukan pertumbuhan. Inkubator memiliki alat pengatur suhu, sehingga temperatur dapat diatur sesuai biakan yang akan diinkubasi. Inkubator memanfaatkan panas-kering seperti oven. Pada beberapa jenis inkubator, kelembapan disediakan dengan memberikan air di dalam inkubator selama periode pertumbuhan mikroba. Lingkungan yang basah memperlambat dehidrasi pada medium sehingga menghindari kondisi lingkungan yang bias

9. Colony Counter

Colony Counter Adalah alat bantu yang digunakan untu menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan dimedia yang disimpan dalam cawan petri. Jenis colony counter ada yang otomatis dan semi otomatis, untuk yang otomatis adalah penghitungan jumlah sudah dilakukan secara otomatis oleh sistem komputerisasi. Sedangkan yang semi otomatis adalah perhitungan dengan cara menyentuh bakteri yang tumbuh kemudian alat akan menghitung secara otomatis.

10. Mikroskop

Mikroskop adalah sebuah alat untuk melihat objek yang sangat kecil (tidak bisa dilihat dengan mata telanjang). Kata mikroskopik berarti sangat kecil, tidak mudah dilihat dengan mata.Mikroskop ditemukan oleh Antony Van Leuwenhoek , dimana sebelumnya sudah ada Robert Hook dan Marcello Malphigi yang mengadakan penelitian melalui Lensa yang sederhana. Lalu Antony Vn Leuwenhoek mengembangkan lensa

sederhana itu menjadi lebih kompleks agar dapat mengamati protozoa , bakteri dan berbagai makhluk kecil lainnya. Setelah itu pada sekitar tahun 1600 Hanz dan Z Jansen telah menemukan mikroskop yang dikenal dengan mikroskop ganda yang lebih baik daripada mikroskop yang dibuat oleh Antony Vaan Leuwenhoek. Mikroskop berasal dari dua buah kata yaitu mikro yang artinya adalah kecil dan dari kata scopium yang artinya adalah pengelihatan. Mikroskop adalah suatu alat yang berada didalam laboratorium yang memberikan bayangan dari benda yang diperbesar hingga ukuran tertentu hingga dapat dilihat dengan mata. Mikroskop cahaya memiliki tiga dimensi lensa yaitu lensa objektif, lensa okuler dan lensa kondensor. Lensa objektif dan lensa okuler terletak pada kedua ujung tabung mikroskop. Lensa okuler pada mikroskop bias membentuk bayangan tunggal (monokuler) atau ganda (binokuler).

11. Biosafety Cabinet

Biological Safety Cabinet atau disebut juga Biosafety Cabinet merupakan area kerja laboratorium dengan ventilasi udara yang telah direkayasa untuk mengamankan pekerja yang bekerja dengan sampel material, lingkungan dan sampel material dari kemungkinan bahaya terkontaminasi atau menimbulkan penyebaran bakteri atau virus yang bersifat patogen. Prinsip kerja BSC (Biological Safety Cabinet) yaitu menciptakan aliran masuk udara untuk melindungi operator yang sedang menangani sampel biologis yang berisiko dengan membuang udara keluar melalui HEPA (*High Efficiency Particular Air*) filter. Tujuan dari penggunaan BSC terutama dalam laboratorium mikrobiologi yaitu untuk melindungi operator dari mikroorganisme. Kebanyakan BSC juga menawarkan produk yang dapat menjaga sampel dari kontaminan ruangan. Pada umumnya terdapat dua jenis BSC berdasarkan kecepatan

aliran udaranya, pertama berdasarkan EN12469 (EU) yaitu berkecepatan di atas 0.40 m/s. Kedua, berdasarkan NSF/ANSI 49 (USA) berkecepatan di atas 0.50 m/s. Biological Safety Cabinet memiliki tipe berdasarkan kelas. Berikut pembagiannya :

1. Biosafety Kelas I

Kecepatan minimum 0,38 m/s. Sementara, jendela depan ruangan tetap dibiarkan terbuka agar udara dapat masuk dan disaring dengan HEPA Filter. Dalam kelas ini, memang akan ada risiko kontaminasi pada sampel. Biasanya, biosafety ini digunakan untuk peralatan khusus seperti centrifuge.

2. Biosafety Kelas II

Di kelas ini, biosafety yang diproteksi ada dua, yaitu produk sampel dan lingkungan. Cara kerjanya, udara dari luar + chamber ditarik oleh kipas hisap yang dipasang di atas lemari, kemudian disaring dengan HEPA Filter, baru digunakan untuk sirkulasi atau balik keluar kembali. Dengan sistem seperti ini, personel tetap aman karena udara diarahkan pada sistem saringan. Sesuai standar dari NSF, biosafety kelas II ini dibagi menjadi 4 tipe yaitu : Tipe A1, Tipe A2, Tipe B1, dan Tipe B2.

3. Biosafety Kelas III

Pada kelas ini, perlindungan yang diberikan sangat maksimal, meliputi personel, produk sampel, dan lingkungan. Ruangan didesain sedemikian rupa sehingga sirkulasi udara di dalam chamber tertutup rapat. Semua material yang keluar masuk harus menggunakan pass box. Personel juga

harus menggunakan sarung tangan agar tidak langsung dengan produk sampel saat bekerja.



Gambar 3. Ilustrasi peneliti bekerja menggunakan Biosafety Cabinet
(Pixabay.com)

BAB 3

TEKNIK IDENTIFIKASI BAKTERI

3.1 Teknik Pewarnaan Dinding Sel (Pewarnaan Gram)

Pewarnaan Gram adalah salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dalam mikrobiologi. Nama teknik ini berasal dari seorang bakteriologis Hans Christian Gram yang pertama kali diperkenalkan pada tahun 1882, yang pada saat itu digunakan untuk mengidentifikasi organisme penyebab pneumonia. Teknik pewarnaan ini menggunakan kristal violet atau metilen blue sebagai pewarna primer. Mikroorganisme yang menunjukkan warna primer atau berwarna ungu dibawah mikroskop dikelompokkan Gram positif, sedangkan yang menunjukkan warna sekunder atau merah dikelompokkan Gram negatif.

Langkah pertama dalam pewarnaan Gram adalah menggunakan kristal violet sebagai pewarna awal pada kaca benda. Langkah selanjutnya adalah fiksasi zat warna, menggunakan iodine untuk membentuk kompleks kristal violet-iodin untuk mencegah hilangnya zat warna. Selanjutnya penggunaan decolorizer, biasanya menggunakan campuran etanol dan aseton, yang gunanya untuk menghilangkan zat warna. Prinsip dasar pewarnaan Gram adalah kemampuan dinding sel bakteri untuk mempertahankan zat warna kristal violet selamat perlakuan decolorizer tersebut. Mikroorganisme Gram positif memiliki kandungan peptidoglikan yang lebih tinggi, sementara mikroorganisme Gram negati memiliki kadar lipid yang lebih tinggi.

Pada tahap awal, semua bakteri menyerap zat warna kristal violet, tetapi setelah menggunakan decolorizer, lapisan lipid pada mikroorganisme Gram negatif akan larut. Dengan larutnya lapisan lipid, Gram negatif akan

kehilangan zat warna primer. Sebaliknya, pelarut akan mendehidrase dinding sel gram positif dengan menutupnya pori-pori mencegah difusi kompleks violet-iodin, sehingga bakteri akan tetap berwarna. Lamanya proses dekolorisasi adalah langkah penting dalam pewarnaan gram, karena paparan yang terlalu lama akan menghilangkan semua warna dari kedua jenis bakteri tersebut. Tahap akhir pewarnaan Gram adalah menggunakan larutan zat warna fuchsin untuk memberikan warna merah muda pada bakteri yang telah mengalami proses dekolorisasi. Hal ini disebut juga counterstain. Beberapa laboratorium menggunakan safranin sebagai counterstain, meskipun demikian, fuchsin lebih sering digunakan dibandingkan safranin. Beberapa bakteri seperti *Hemophilus* spp, *Legionella* spp dan beberapa bakteri anaerob sulit untuk diwarnai dengan safranin.

3.1.1 Prosedur Pewarnaan Gram

Alat yang digunakan dalam pewarnaan Gram adalah :

1. Pembakar Bunsen
2. Slide mikroskop yang telah dibersihkan dengan alkohol
3. Rak slide
4. Mikroskop

Reagensia yang digunakan untuk pewarnaan Gram adalah

1. Kristal violet (pewarna primer)
2. Larutan Gram iodine (mordant)
3. Aseton/etanol (50:50 v/v) (decolorizer)
4. 0,1% larutan fuchsin (counterstain)
5. Air

Prosedur

1. Preparasi apusan slide

- Loop inokulasi digunakan untuk memindahkan kultur ke slide mikroskop
- Jika cawan petri atau agar miring memiliki koloni bakteri, teteskan air untuk memudahkan pemindahan sejumlah kecil koloni bakteri ke kaca benda
- Kultur bakteri disebarakan dengan menggunakan loop inokulasi hingga membentuk lingkaran dengan diameter sekitar 15 mm.
- Kaca benda dapat dikering anginkan atau dibantu dengan menggunakan sedikit panas dari Bunsen untuk proses fiksasi.

2. Pewarnaan Gram

- Ditambahkan pewarna kristal violet ke kultur bakteri yang telah difiksasi
- Setelah 10 hingga 60 detik, zat warna dibuang dan sisa zat warna dibersihkan dengan air mengalir. Tujuannya adalah untuk mencuci zat warna tanpa kehilangan kultur bakteri yang telah difiksasi tersebut
- Larutan iodine digunakan untuk menutupi apusan selama 10 hingga 60 detik. Tujuannya adalah untuk memfiksasi zat warna. Iodin lalu dibuang dan kaca benda kembali dibersihkan dengan air mengalir.
- Beberapa tetes decolorizer ditambahkan ke kaca benda. Decolorizer adalah campuran antara etanol dan aseton. Kaca benda dicuci dengan air mengalir selama 5 detik

- Apusan di counterstain dengan fuchsin selama 40 hingga 60 detik. Larutan fuchsin dicuci dengan air dan sisa air yang berlebih dikeringkan dengan tissue. Kaca benda juga bisa dikering anginkan.
3. Pemeriksaan Mikroskopik Kaca Benda
- Kaca benda harus ditetaskan terlebih dahulu dengan minyak imersi
 - Pemeriksaan awal kaca benda tersebut harus menggunakan perbesaran 40X untuk mengevaluasi distribusi apusan, dan kemudian dilanjutkan dengan perbesaran 100X

Pewarnaan Gram kemungkinan gagal atau tidak akurat dalam mengamati morfologi bakteri, kemungkinan disebabkan oleh hal-hal berikut seperti : penggunaan antibiotik sebelum mengumpulkan spesimen, kultur bakteri yang berusia terlalu muda atau terlalu tua, memfiksasi apusan sebelum kering, apusan yang terlalu tebal, konsentrasi kristal violet yang terlalu rendah, fiksasi dengan menggunakan panas yang terlalu lama, pencucian yang berlebihan, kurangnya paparan dengan iodin, proses decolorization yang terlalu lama, counterstain yang terlalu berlebihan dan kurangnya pengalaman.

3.2 Karakterisasi Biokimia

Uji biokimia merupakan salah uji yang digunakan untuk menentukan spesies kuman yang tidak diketahui sebelumnya. Setiap kuman memiliki sifat biokimia yang berbeda sehingga tahapan uji biokimia ini sangat membantu proses identifikasi. Setelah sampel diinokulasikan pada media differensial atau selektif, kemudian koloni kuman diinokulasikan pada media uji biokimia. Ada 12 jenis uji yang sering digunakan dalam uji biokimia

walaupun sebenarnya masih banyak lagi media yang dapat digunakan. Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni selama reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi maupun yang menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel dan untuk kegiatan selular, seperti pergerakan.

Suatu bakteri tidak dapat di determinasi hanya berdasarkan sifat-sifat morfologinya saja, sehingga perlu diteliti sifat-sifat biokimia dan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhannya. Ciri fisiologi ataupun biokimia merupakan kriteria yang amat penting di dalam identifikasi spesimen bakteri yang tidak dikenal karena secara morfologis biakan ataupun sel bakteri yang berbeda dapat tampak serupa, tanpa hasil pengamatan fisiologis yang memadai mengenai kandungan organik yang diperiksa maka penentuan spesiesnya tidak mungkin dilakukan. Karakterisasi dan klasifikasi sebagian mikroorganisme seperti bakteri berdasarkan pada reaksi enzimatik maupun biokimia. Mikroorganisme dapat tumbuh pada beberapa tipe media yang memproduksi tipe metabolit yang dapat dideteksi dengan reaksi antara mikroorganisme dengan reagen test yang dapat menghasilkan perubahan warna reagen. Berikut adalah beberapa parameter karakterisasi biokimia bakteri (Nadeak, 2019) :

1. Fermentasi karbohidrat

Fermentasi merupakan proses oksidasi biologi dalam keadaan anaerob dimana yang bertindak sebagai substrat adalah karbohidrat. Dimana hasil dari fermentasi ini berbeda-beda bergantung pada jenis bakterinya misalnya saja asam laktat, asam cuka, CO₂ dan asam tertentu lainnya. Beberapa mikroorganisme seperti *E. coli*, dapat menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Selain laktosa, substrat alamiah dari

enzim, adalah bahan yang sangat penting, Berikut ini beberapa jenis bakteri yang mampu melakukan fermentasi terhadap karbohidrat serta hasil fermentasinya, adalah :

- a. Fermentasi asam laktat : Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus*, *Streptococcus*)
 - b. Fermentasi alkohol : *Zygomonas*, *Saccharomycetes*
 - c. Fermentasi asam propionate : bakteri asam propionate (*propionibacterium*)
 - d. Fermentasi 2,3 butanadiol : *Enterobacter*, *Serralia*, *Bacillus*
 - e. Fermentasi asam campuran : Bakteri enteric (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*)
 - f. Fermentasi asam butirat : *Clostridium*
2. Uji MRVP

Pengujian dengan menggunakan metil merah, Voges-Proskueur, uji Indol, serta uji penggunaan sitrat sering dikenal sebagai tes IMViC (Indole, Methyl Red, Voges-Proskueur dan citrate). Tes IMViC ini digunakan untuk membedakan beberapa bakteri golongan Enterobacteriaceae, berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi glukosa dan laktosa, penguteraan triptofan yang menghasilkan indol serta adanya enzim sitrat permease yang mampu menguraikan natrium sitrat dari medium khusus yang digunakan.

Uji Voges-Proskueur digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang melakukan fermentase dengan hasil akhir 2,3 butanadiol. Bila bakteri memfermentasikan karbohidrat menjadi 2,3 butanadiol sebagai produk utama, akan terjadi penumpukan bahan tersebut dalam media pertumbuhan. Pada uji VP ini dilakukan penambahan 40% KOH dan 5% larutan alfa naftol pada saat pengamatan. Hal ini dapat menentukan adanya asetoin (asetil metil karbinol), suatu

senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol. Dengan adanya penambahan KOH 40 %, keberadaan setoin ditunjukkan dengan perubahan warna medium menjadi merah, dan perubahan ini makin jelas dengan penambahan alfa naftol beberapa tetes. Uji VP ini sebenarnya merupakan uji tidak langsung untuk mengetahui adanya 2,3 butanadiol. Karena uji ini lebih dulu menentukan asetoin, dan seperti yang kita ketahui bahwa asetoin adalah senyawa pemula dalam sintesis 2,3 butanadiol, sehingga dapat dipastikan bahwa dengan adanya asetoin dalam media berarti menunjukkan adanya produk 2,3 butanadiol sebagai hasil fermentasi.

3. Uji katalase

Katalase adalah enzim yang mengkatalisis penguraian hydrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguarikan zat toksik tersebut.

Uji katalase ini dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok bakteri bentuk kokkus, dalam membedakan *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Dimana kelompok streptococcus bersifat katalase negatif dan *Staphylococcus* bersifat katalase positif. Penentuan adanya katalase ini terlihat dari pembentukan gelembung udara di sekitar koloni setelah ditambahkan larutan H_2O_2 3%. Reaksi kimiawi yang dikatalisasikan oleh enzim terlihat sebagai berikut :

4. Uji Pereaksi Indol

Mikroorganisme menggunakan asam amino sebagai pemuka protein, komponen sel dan kadang kala sebagai sumber energi. Asam amino ini dimodifikasikan dengan berbagai cara sewaktu metabolisme. Dalam percobaan diperlihatkan berbagai cara mikroorganisme memodifikasikan

asam amino. Dimana modifikasi asam amino dapat digunakan untuk pengidentifikasian untuk suatu jenis bakteri.

Asam amino triptofan merupakan komponen asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganismenya. Dimana asam amino triptofan apabila dihidrolisis oleh enzim triptofamase akan menghasilkan indol dan asam pemuat

5. Uji Oksidasi Fermentasi

Fermentasi dan oksidasi adalah dua proses penting dalam metabolisme mikroorganismenya. Dimana tujuan akhirnya adalah akumulasi energi, baik untuk aktivitas mikroorganismenya maupun untuk proses-proses biologis lain. Oksidasi umumnya dilakukan pada respirasi aerobik menghasilkan CO₂ dan H₂O, sedangkan fermentasi menghasilkan etanol dan gas. Adapun uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan mikroorganismenya untuk menggunakan karbohidrat dengan cara fermentasi atau oksidasi.

6. Uji Motilitas

Motilitas adalah salah satu dari ciri makhluk hidup, begitu pula dengan mikroorganismenya, namun alat geraknya masih sederhana berupa flagella atau cilia. Bakteri melakukan motilitas dengan menggunakan energi yang diperoleh dari ATP yang diuraikan oleh koenzim ATP-ase membentuk fosfo anorganik. Uji motilitas bakteri pada umumnya dilakukan pada media semi solid. Pada media semi solid, bakteri dapat “bergerak” dan membentuk pola pergerakan terdifusi yang mudah dikenali oleh mata telanjang. Pada umumnya media yang digunakan adalah media SIM (*Sulphide Indole Motility Medium*). Media ini memiliki konsistensi yang sangat lunak yang menjadikan bakteri motil bermigrasi didalam media

tersebut menyebabkan kekeruhan. Inoculum ditancapkan cukup dalam ke tengah-tengah media agar semisolid. Motilitas bakteri ditunjukkan dengan adanya zona difusi yang menyebar dari garis inokulasi, sementara bakteri non motil hanya tumbuh di daerah tempat mereka diinokulasikan (Aryal, 2019).

3.3 Identifikasi Molekuler

Dibidang mikrobiologi, identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi memegang peranan yang sangat penting. Hal ini berkaitan dengan ketepatan terapi, pencegahan transmisi, serta pencegahan terjadinya resistensi antimikroba. Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi secara konvensional dilakukan melalui metode pembiakan dan dilanjutkan dengan pemeriksaan karakteristik fisiologis dan biokimia. Metode ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Terlebih lagi pada beberapa mikroorganisme yang sulit untuk dibiakkan seperti *mycobacterium* dan virus tertentu. Saat ini dikembangkan metode identifikasi berbasis molekuler yang lebih cepat dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, yaitu dengan analisis sekuensing gen 16S rRNA (16S ribosomal Ribonucleic acid/Asam ribonukleat pengkode ribosom 16S, S menyatakan Svedberg, yaitu satuan ukuran ribosom). Gen 16S rRNA juga sering disebut sebagai 16S rDNA (16S ribosomal deoxyribose nucleatic acid), namun menurut konsensus dari American Society for Microbiology (ASM), istilah 16S rRNA dinilai lebih tepat.

Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*). Porsi sekuens rDNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas

organisme tersebut. Daerah yang lestari ini juga yang menyebabkan gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing^{3,4}. Gen pengkode rRNA digunakan untuk menentukan taksonomi, filogeni (hubungan evolusi) serta memperkirakan jarak keragaman antar spesies (*rates of species divergence*) bakteri.

3.3.1 Pemilihan gen 16S rDNA sebagai Target Sekuensing

Gen pengkode rRNA adalah gen yang mampu mempertahankan kelestariannya selama jutaan tahun keanekaragaman evolusi. Sebagian besar prokariot memiliki 3 jenis rRNA, yaitu 5S, 16S dan 23S. Gen 16S rRNA adalah salah satu gen yang telah dikarakterisasi dengan baik sehingga digunakan dalam identifikasi mikroorganisme. Ribuan sekuens dari berbagai isolat klinis dan dari lingkungan telah terkumpul di satu database yaitu *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) yang dapat diakses pada www.ncbi.nlm.nih.gov, serta Ribosomal Database Project yang dapat diakses di www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html. Database ini juga menyediakan aplikasi yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens yang diperoleh dengan sekuens yang telah terdaftar di database tersebut. Sejak ditemukan pertama kali oleh Woese, sekuens 16S rDNA semakin banyak digunakan. Pada tahun 1980-an telah dikembangkan standar terbaru dalam mengidentifikasi bakteri. Penelitian Woese menunjukkan bahwa sifat yang *conserved* dari gen 16S rRNA diduga disebabkan karena peran yang sangat esensial dari gen ini terhadap fungsi sel. Pada gen-gen yang mengkode enzim, mutasi dapat terjadi lebih sering dan umumnya dapat ditolerir oleh sel karena hanya menyebabkan perubahan struktur dan biasanya tidak memegang peranan yang krusial seperti halnya rRNA. Pada bakteri, jika terdapat gen yang mengkode enzim yang dibutuhkan untuk

penggunaan laktosa, maka bakteri dapat menggunakan gula lain atau protein sebagai sumber energi.

3.3.2 Aplikasi Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi

Metode sekuensing telah mengalami perkembangan yang cukup pesat. Perkembangan teknologi saat ini telah memungkinkan dilakukannya analisis terhadap jutaan sekuens DNA per tahun. Kualitas analisis sekuensing sangat tergantung pada faktor kecepatan prosedur kerja dan teknologi yang digunakan. Identifikasi mikroorganisme penyebab infeksi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri dari berbagai spesimen klinis pada media tertentu.

Pada metode mikrobiologi konvensional membutuhkan waktu yang lama pada saat identifikasi berdasarkan karakteristik fisiologis dan biokimianya sedangkan pada identifikasi berbasis molekuler melalui analisis sekuensing, waktu yang dibutuhkan jauh lebih singkat. Langkah analisis sekuensing dimulai dengan mengisolasi DNA dari kultur bakteri, baik kultur padat maupun cair. DNA yang diperoleh akan dijadikan sebagai cetakan dalam tahap amplifikasi dengan PCR. Primer yang digunakan dalam PCR adalah primer 16S rRNA yang bersifat universal berukuran sekitar 1500 pb, sehingga dapat mengamplifikasi daerah 16S rRNA dari seluruh bakteri. Produk PCR dimurnikan terlebih dahulu dengan menggunakan kit komersial untuk menghilangkan sisa-sisa primer serta fragmen nukleotida. Produk PCR yang telah dimurnikan ditentukan urutan nukleotidanya dengan metode sekuensing (Rinanda, 2011). Sekuens DNA terbentuk dari hasil pensejajaran pembacaan *primer reverse* dan *forward* dan umumnya disebut sebagai sekuens konsensus (*consensus sequence*). Sekuens konsensus ini kemudian dibandingkan dengan data sekuens yang tersedia di database menggunakan software tertentu. Beberapa sistem dapat menentukan urutan nukleotida melalui pembacaan satu primer, namun pembacaan dengan dua primer memberikan hasil yang lebih akurat. Beberapa database yang dapat

digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>) dan *Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms* (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>). Analisis sekuensing gen 16S rRNA saat ini sudah banyak digunakan, terutama di bidang penelitian. Pemakaian di bidang klinis sebagai prosedur diagnostik memang belum banyak digunakan terkait dengan biaya pemeriksaan yang mahal. Namun tidak dapat dipungkiri bahwa tuntutan akan suatu metode diagnostik dengan tingkat spesifisitas dan sensitivitas tinggi, cepat dan akurat mengharuskan adanya aplikasi berbasis molekuler ini dalam identifikasi berbagai sampel klinis. Sekuensing gen 16S rRNA juga digunakan untuk mengidentifikasi bakteri tertentu yang tidak dapat diidentifikasi lagi secara fenotip. *Streptococcus pneumonia* adalah bakteri Gram positif yang dapat dikarakterisasi secara fenotipik berdasarkan sensitivitasnya terhadap antibiotik optochin. Namun saat ini *S. pneumonia* telah mengembangkan resistensi terhadap optochin sehingga diperlukan metode identifikasi lain yang lebih akurat.

BAB 4

ENZIM

4.1 Definisi Enzim

Enzim adalah biomolekul yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia. Bila zat ini tidak ada maka proses-proses tersebut akan berlangsung lambat atau bahkan tidak berlangsung sama sekali. Hampir semua enzim merupakan protein. Enzim adalah biokatalisator, yang artinya dapat mempercepat reaksi-reaksi biologi tanpa mengalami perubahan struktur kimia. Pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim, molekul awal reaksi disebut sebagai substrat, dan enzim mengubah molekul tersebut menjadi molekul-molekul yang berbeda disebut produk. Hampir semua proses biologis sel memerlukan enzim agar dapat berlangsung dengan cepat.

Menurut Kuhne (1878) enzim berasal dari kata *in* + *zyme* yang berarti sesuatu di dalam ragi. Berdasarkan penelitian maka dapat disimpulkan bahwa enzim adalah suatu protein yang berupa molekul-molekul besar. Pada enzim terdapat bagian protein yang tidak tahan panas yaitu apoenzim, sedangkan bagian yang bukan protein adalah bagian yang aktif dan diberi nama gugus prostetik, biasanya berupa logam seperti besi, tembaga, seng atau suatu bahan senyawa organik yang mengandung logam.

Apoenzim dan gugus prostetik merupakan suatu kesatuan yang disebut dengan holoenzim, tetapi ada juga bagian enzim yang apoenzim dan gugus prostetiknya tidak menyatu. Bagian gugus prostetik yang lepas kita sebut koenzim, yang aktif seperti halnya gugus prostetik. Contoh koenzim adalah vitamin atau bagian vitamin (misalnya: vitamin B1, B2, B6, niasin dan biotin).

Sel hidup ibarat pabrik kimia yang bergantung pada energi yang harus mengikuti berbagai kaidah kimia. Reaksi kimia yang memungkinkan adanya kehidupan disebut metabolisme. Terdapat ribuan reaksi berkesinambungan yang terjadi di dalam setiap sel, sehingga metabolisme merupakan reaksi yang menakjubkan. Agar sel berfungsi dan berkembang dengan sebagaimana mestinya, lintasan metaboliknya harus diatur dengan seksama. Sel dapat mengatur lintasan metabolik yang mana yang bejalan, dan seberapa cepat, dengan cara memproduksi katalis yang tepat yang dinamakan enzim, dalam jumlah yang sesuai pada saat diperlukan. Hampir semua reaksi kimia kehidupan berlangsung sangat lambat tanpa katalis, dan enzim merupakan katalis yang lebih khas dan lebih kuat dibandingkan dengan ion logam atau senyawa anorganik lainnya yang dapat diserap tumbuhan dari tanah.

Enzim juga jauh lebih spesifik dari pada katalis anorganik atau bahkan katalis organik sintetik dalam hal ragam reaksi yang dapat dikatalisis, sehingga reaksi dapat dikendalikan dengan terbentuknya senyawa tertentu yang yang dibutuhkan untuk kebutuhan senyawa tertentu yang dibutuhkan untuk kehidupan. Katalisator bersifat umum, hanya berfungsi untuk mempercepat reaksi yang dapat digunakan berulang-ulang (satu katalisator mampu mereaksikan 2 atau 3 bahkan lebih reaksi). Enzim bersifat lebih spesifik hanya digunakan untuk satu reaksi saja (satu enzim hanya untuk satu reaksi).

4.2 Sifat-Sifat dan Nomenklatur

Sifat-sifat enzim adalah sebagai berikut :

1. Enzim aktif dalam jumlah yang sangat sedikit. Dalam reaksi biokimia hanya sejumlah kecil enzim yang dibutuhkan untuk mengubah sejumlah besar substrat menjadi produk hasil.

2. Enzim tidak terpengaruh oleh reaksi yang dikatalisisnya pada kondisi stabil. Karena sifat protein dan enzim, aktivitasnya dipengaruhi antara lain oleh pH dan suhu. Pada kondisi yang dianggap tidak optimum suatu enzim merupakan senyawa relatif tidak stabil dan dipengaruhi oleh reaksi yang dikatalisisnya.
3. Walaupun enzim mempercepat penyelesaian suatu reaksi, enzim tidak mempengaruhi kesetimbangan suatu reaksi tersebut. Tanpa enzim reaksi dapat balik yang biasa terdapat pada sistem hidup berlangsung ke arah kesetimbangan pada laju yang lambat. Suatu enzim akan menghasilkan kesetimbangan reaksi itu pada kecepatan yang lebih tinggi.
4. Kerja katalis enzim spesifik. Enzim menunjukkan kekhasan suatu reaksi yang dikatalisisnya. Suatu enzim yang mengkatalisis satu reaksi, tidak akan mengkatalisis reaksi yang lain.

Lebih dari 5000 macam enzim telah ditemukan pada organisme hidup, dan akan bertambah terus berjalan dengan terus berlangsungnya penelitian. Tiap enzim dinamai menurut sistem baku dan juga diberi nama umum yang sederhana. Pada kedua sistem tersebut, nama enzim umumnya diakhiri dengan -ase dan mencirikan substrat yang terlibat dan jenis reaksi yang dikatalisisnya. Sebagai contoh sitokrom oksidase, suatu enzim utama dalam respirasi, mengoksidasi (melepas electron dari) molekul sitokrom. Asam malat dehydrogenase : melepaskan dua atom hydrogen dari (mengdehidrogenasi) asam malat. Nama umum ini walaupun singkat tidak memberikan keterangan yang cukup tentang reaksi yang dikatalisis. Contoh di atas tidak menjelaskan siapa penerima electron atau atom hydrogen yang dilepaskan.

Persatuan Internasional Biokimia memberi nama lebih panjang tapi lebih deskriptif dan baku bagi semua enzim yang telah dicirikan dengan jelas. Sebagai contoh sitokrom oksidase dinamakan sitokrom c:O oksidoreduktase,

menunjukkan bahwa elektron dilepaskan dari sitokrom tertentu, yakni jenis c, dan molekul oksigen adalah penerima elektron. Dehidrogenase asam malat di sebut L-malat:NAD oksidoreduktase, menunjukkan enzim tersebut khas untuk bentuk L-asam malat terionisasi, dan molekul yang disingkat NAD adalah penerima atom hydrogen. Biasanya enzim mempunyai akhiran -ase. Di depan -ase digunakan nama substrat di mana enzim itu bekerja, atau nama reaksi yang dikatalisis. Misal : selulase, dehidrogenase, urease, dan lain-lain. Tetapi pedoman pemberian nama tersebut diatas tidak selalu digunakan. Hal ini disebabkan nama tersebut digunakan sebelum pedoman pemberian nama diterima dan nama tersebut sudah umum digunakan. Misalnya pepsin, tripsin, dan lain-lain. Dalam Daftar Istilah Kimia Organik (1978), akhiran -ase tersebut diganti dengan -asa. Enzim diberi nama dengan menambahkan akhiran ase terhadap nama substrat yang diubah oleh enzim tersebut, misalnya enzim amilase mengubah amilum menjadi glukosa; enzim yang mengubah lemak (lipid) adalah lipase; enzim-enzim yang mengadakan perubahan karbohidrat merupakan kelompok karbohidrase.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

1. Suhu

Pada umumnya semakin tinggi suhu, semakin naik laju reaksi kimia, baik yang tidak dikatalis maupun yang dikatalisis oleh enzim. Tetapi perlu diingat bahwa enzim adalah protein, jadi semakin tinggi suhu, proses inaktivasi enzim juga meningkat. Keduanya mempengaruhi laju reaksi enzimatik secara keseluruhan. Pengaruh suhu terhadap enzim ternyata agak kompleks, misalnya suhu yang terlalu tinggi dapat mempercepat pemecahan atau kerusakan enzim, sebaliknya semakin tinggi suhu (dalam batas tertentu) semakin aktif enzim tersebut. Bila suhu masih naik terus, laju kerusakan enzim akan melampaui reaksi katalis enzim. Pada suhu rendah, laju inaktivasi

enzim begitu lambat atau sangat kecil sehingga boleh diabaikan. Sebaliknya pada suhu tinggi, laju inaktivasi enzim cepat sekali, sehingga reaksi enzimatik praktis berhenti sama sekali.

2. pH

Pada umumnya enzim bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun pada gugus basanya. Enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada suatu kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai pH optimum yang sangat sempit. Disekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Perlu diketahui pada enzim yang sama sering pH optimumnya berbeda, tergantung asal enzim tersebut. Pengendalian pH mempengaruhi aktivitas enzim yang sangat diperlukan dalam praktek teknologi pangan. Pengaturan pH harus bertujuan untuk mendapatkan keaktifan enzim yang maksimal.

3. Kadar air pada substrat

Kadar air dari bahan sangat mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Pada kadar air bebas yang rendah terjadi halangan dan rintangan sehingga baik difusi enzim atau substrat terhambat. Akibatnya hidrolisis hanya terjadi pada bagian substrat yang langsung berhubungan dengan enzim.

4.3 Klasifikasi Enzim

Berdasarkan tipe reaksi yang diketahuim enzim dibagi menjadi 6 kelompok (Risnoyatiningsih, 2008) :

1. 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 dehydrogenase. Oksidase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi antara substrat dengan molekul oksigen. Dehydrogenase adalah enzim yang aktif dalam pengambilan atom hydrogen dari substrat

2. Transferase

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

3. Hydrolase

Enzim hydrolase merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam pengolahan pangan, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrata tau pemecahan substrat dengan pertolongan air. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini diantaranya adalah amilase, invertase, selulase dan sebagainya.

4. Liase

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

5. 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 aldose menjadi ketosa.

6. 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.

Kelebihan enzim dibandingkan dengan bahan kimia lain sebagai katalisator yaitu enzim hanya mengkatalis substrat tertentu, enzim tidak menghasilkan produk sampingan yang tidak diperlukan, memiliki spesifisitas tinggi, dapat mengurangi biaya karena produktifitas yang tinggi dan ramah lingkungan karena produk akhirnya yang tidak berbahaya. Pemanfaatan enzim dalam produksi dan juga perdagangan enzim sekarang ini didominasi enzim-enzim seperti enzim lipase, amilase, katalase dan protease.

Enzim protease merupakan enzim kompleks yang dapat di aplikasikan pada produk-produk komersial ataupun bidang fisiologis. Enzim ini dapat mempercepat pemecahan ikatan peptide dalam polipeptida dan protein menggunakan reaksi hidrolisis sehingga menjadi ikatan yang lebih sederhana. Enzim protease memiliki banyak sekali manfaat, diantaranya sebagai berikut:

1. Enzim protease dalam dunia medis banyak dimanfaatkan sebagai terapi untuk pengobatan radang, tumor dan kelainan darah. Enzim protease juga memiliki manfaat menjaga kekebalan tubuh dari serangan bakteri ataupun virus, hal ini dikarenakan enzim protease dapat mencerna partikel-partikel yang tidak di inginkan di darah seperti bakteri dan virus.
2. Enzim protease dalam bidang industri menjadi enzim yang paling banyak digunakan karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi serta dapat diaplikasikan secara luas, mencapai 60% dari seluruh penjualan enzim di dunia. Pemanfaatan enzim protease pada industri banyak di aplikasikan pada produk-produk kulit, pengepakan daging, produk makanan, pengolahan limbah dan industri farmasi atau obat-obatan.
3. Enzim protease pada industri detergent dimanfaatkan sebagai penghidrolisa noda protein pada pakaian sehingga noda noda yang

mengandung protein seperti lendir, keringat, darah dan lainnya dapat dengan mudah tercuci.

Enzim protease atau biasa disebut dengan proteinase atau peptidase digolongkan dalam enzim hidrolase yang akan memecah enzim menjadi molekul-molekul sederhana seperti menjadi oligopeptida yang pendek ataupun asam amino.

Enzim protease menurut Hartley (1960) dibagi atas 4 golongan yaitu:

1. Protease sulfhidril

Protease ini pada sisi aktifnya terdapat residu sulfhidril. Senyawa-senyawa yang dapat menghambat protease ini antara lain oksidator, alkilator dan logam berat. Yang termasuk dari enzim protease sulfhidril adalah papain, fisin dan bromelin.

2. Protease serin

Protease serin pada sisi aktifnya terdapat residu serin. Protease ini bersifat endopeptidase dan yang termasuk ke dalam enzim protease ini antara lain tripsin, elastase, subtilin dan kimotripsin.

3. Protease metal

Protease metal pada sisi aktifnya terdapat metal. Protease ini dapat dihambat dengan adanya EDTA (*ethylene diamine tetra acetic acid*), yang termasuk ke dalam enzim protease ini antara lain karboksipeptidase

4. Protease asam

Protease asam pada sisi aktifnya terdapat dua gugus karboksil. Protease ini dapat dihambat dengan adanya p-bromo fenasilbromida dan yang termasuk ke dalam enzim protease ini antara lain renin, pepsin, dan protease kapang.

Enzim protease dapat diaplikasikan secara luas baik dalam hal ekonomi, industri maupun dalam dunia medis. Dalam hal ekonomi, enzim protease mempunyai nilai yang tinggi karena sangat diperlukan secara luas, dalam bidanga industri enzim protease sering dimanfaatkan dalam pembuatan deterjen, keju, bir, tekstil, kulit, pengolahan susu dan penanganan limbah, sedangkan dalam dunia medis enzim protease dimanfaatkan untuk keperluan terapi tumor, kelainan darah, radang dan juga untuk mengatur kekebalan tubuh. Berikut pengaplikasian enzim protease secara spesifik.

Tabel 1. Aplikasi Enzim Protease

No	Jenis Enzim Protease	Fungsi	Sumber
1	Papain	Sebagai pengawet bir dan pengempuk daging	Pepaya
2	Bromelin	Penjernih bir	Nenas
3	Fisin	Sebagai pengawet bir dan pengempuk daging	Getah pohon ficus
4	Renin	Proses pembuatan keju dan pudding	Lambung anak domba, sapi atau kambing
5	Enzim protease dari kapang	Industri keju	<i>Penicillium roqueforti</i>
6	Enzim protease dari bakteri	Menghidrolisis hemoglobin, kasein dan gelatin	Enzim subtilin dari <i>B.Subltilis</i>
7	Tripsin	Memecah ikatan peptida antara lysine dan	Kelenjar pankreas
8	Pepsin		

9	Kolagenase	arginine Pencernaan protein di usus	Mikroba dalam lambung hewan dan manusia <i>Clostridium perfringens</i>
	Elastase	Menghidrolisis kolagen	Pankreas
10	Kimotripsinogen	Menghidrolisis elastin (elastin memecah ikatan peptide pada asam amino non-aromatik dan tidak bercabang)	Kelenjar pankreas
11		Hanya memecah ikatan peptide pada asam amino aromatic seperti tirosin, phenilalanin dan tryptophan	
12	Keratinase	Memcah ikatan disulfide pada keratin	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces microflavus</i>

BAB 5

BAKTERI ASAM LAKTAT

5.1. Definisi dan Klasifikasi Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat disebut bakteri baik di sekitar kita. Walaupun terkadang berbahaya, karena asam laktat yang dihasilkan membuat makanan kita menjadi asam (asam), seperti yoghurt, yoghurt memang sangat populer di beberapa daerah, seperti dadih (di Sumatera bagian utara) dan yoghurt, ini sudah tidak asing lagi di masyarakat dunia. Bakteri asam laktat didefinisikan sebagai kelompok bakteri gram positif berbentuk bulat atau batang yang tidak toleran terhadap spora, mikrooksigen, tidak melakukan respirasi, dan tidak memiliki katalase. produk akhir utama. Karbohidrat yang difermentasi. Bakteri organik kemotaktik ini hanya dapat tumbuh pada media yang kompleks. Sumber energi utama adalah karbohidrat yang dapat difermentasi. Heksosa terutama terdegradasi menjadi asam laktat (kelompok fermentasi yang sama) atau asam laktat dan produk lainnya, seperti asam asetat, etanol, CO₂, asam format, dan asam suksinat (kelompok heterofermentasi). Genera yang terlibat dalam industri makanan adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. Genus lainnya adalah *Aerococcus*, *Sarcobacter*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus* (Hassan, 2020).

Istilah bakteri asam laktat pada awalnya diciptakan oleh seseorang yang bekerja di perusahaan susu fermentasi untuk menunjukkan bahwa ada spesies atau strain yang dapat menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar dari metabolisme laktosa. Bakteri ini sering disebut starter dan sering digunakan untuk memulai proses fermentasi. Kelompok yang disebut Bakteri Asam Laktat (BAL) saat ini termasuk dalam genus *Lactococcus*,

Streptococcus (hanya satu jenis), *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, dll. Kemudian dari waktu ke waktu, kedua istilah tersebut digunakan dalam proses fermentasi bahan pangan hasil ternak yakni susu dan daging, serta digunakan untuk sayuran dan untuk produk fermentasi lainnya (Axelson, 1998).

Nama BAL diperoleh dari kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. BAL juga ada ditubuh manusia sebagai flora normal tubuh manusia. Selain pada manusia, bakteri ini juga dapat ditemukan pada produk sayuran dan susu. Bakteri ini terdiri atas beberapa filum Firmicutes. Genera tersebut adalah *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Melisococcus*, *Weisella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc* dan *Carbobacterium*. *Bifidobacterium* sering diklasifikasikan sebagai *Lactobacillus*, tidak memiliki hubungan filogenetik dengan bakteri asam laktat dan memiliki cara sendiri dalam memfermentasi gula. Klasifikasi BAL pada masing-masing genus terutama didasarkan pada perbedaan morfologi, metode fermentasi glukosa pertumbuhan pada suhu yang berbeda, konfigurasi asam laktat yang dihasilkan, kemampuan tumbuh pada lingkungan konsentrasi garam tinggi, dan toleransi terhadap lingkungan asam atau basa (Salminen & A Von, n.d.).

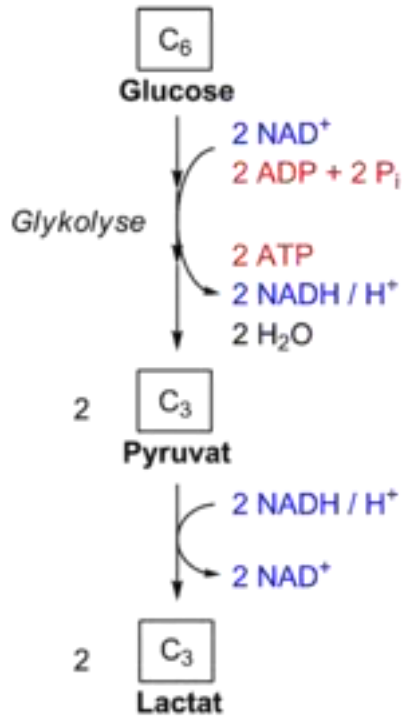
Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang biasa digunakan sebagai probiotik. Bakteri ini non-patogen, tidak beracun, Gram-positif, anaerobik, tidak menghasilkan spora, bakteri penghasil asam laktat yang dihasilkan oleh fermentasi karbohidrat. BAL merupakan kelompok bakteri Gram positif berbentuk kokus atau basil, tidak membentuk spora, suhu optimum $\pm 40^{\circ}\text{C}$, umumnya tidak bergerak, anaerob, katalase negatif dan oksidase positif, dengan asam laktat sebagai produk utama Fermentasi karbohidrat. Sifat khusus bakteri asam laktat adalah dapat tumbuh di bawah kadar gula,

alkohol, dan garam yang tinggi, serta dapat memfermentasi monosakarida dan disakarida (Syahrurachman, 1994). Dari hasil metabolisme gula, BAL dibagi menjadi dua kategori, yaitu homofermentasi dan heterofermentasi. BAL homofermentasi mengubah 95% glukosa atau heksosa lain menjadi asam laktat dan sejumlah kecil CO₂ dan asam volatil. BAL heterofermentatif menghasilkan asam asetat, asam laktat, CO₂ dan etanol dalam jumlah yang sangat besar. Bakteri asam laktat dapat dibedakan atas 2 kelompok berdasarkan hasil fermentasinya, yaitu:

1. Bakteri homofermentatif

Glukosa difermentasi untuk menghasilkan asam laktat sebagai satu-satunya produk. Bakteri dalam kelompok ini akan mengubah heksosa menjadi asam laktat melalui jalur Embden-Meyerhof (EM), dan tidak dapat memfermentasi asam pentosa atau glukonat. Asam laktat adalah satu-satunya produk. Contoh: *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan beberapa *Lactobacilli*.

Jika proses fermentasi hanya menghasilkan satu komponen (misalnya asam laktat), maka proses fermentasi tersebut homofermentasi, dan jika menghasilkan campuran beberapa senyawa atau komponen lain (misalnya asetat, etanol, karbohidrat dan asam laktat), maka proses fermentasi tersebut heterofermentasi secara khusus. Fermentasi homofermentatif menghasilkan asam laktat dalam jumlah berlimpah. Prosesnya dimulai dari perombakan glukosa dengan dibantu enzim aldolase yang ujungnya adalah menjadi gliseraldehid-3-P dan dihidroksiakton-P. Kemudian, gliseraldehid-3-P dirombak menjadi asam piruvat. Satu molekul asam piruvat selanjutnya dikonversi menjadi dua molekul asam laktat (Rahmadi, 2019).



Gambar 4. Fermentasi asam laktat homofermentatif (Wikipedia)

2. Bakteri Heterofermentatif

Selain menghasilkan asam laktat, glukosa juga menghasilkan fermentasi etanol, asam asetat, dan senyawa lain seperti CO_2 . Heksosa difermentasi dengan asam laktat, karbon dioksida dan etanol (atau asam asetat, akseptor elektron alternatif). Pentosa kemudian diubah menjadi asam laktat dan asam asetat. Contoh: *Leuconostoc* dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Di sisi lain, fermentasi heterofermentasi melibatkan enzim fosfo ketolase, yang meliputi produk akhir gliseraldehida 3P dan asetil fosfat. Selanjutnya, senyawa asetil fosfat ini diubah menjadi asetaldehida, yang diproduksi sebagai etanol, cuka, dan produk sampingan lainnya. BAL menghasilkan senyawa antimikroba yang lebih beragam, termasuk spesies heterofermentatif. Meskipun fermentasi merupakan jenis heterofermentasi, produksi asam laktat masih mendominasi metabolisme BAL.

Bakteri asam laktat dapat mengurangi pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli*. Karena di usus halus, bakteri asam laktat dan *E. coli* bersaing untuk mendapatkan nutrisi. Bakteri asam laktat dapat menempel pada sel epitel usus membentuk koloni dan menghasilkan zat antibakteri, sehingga bahwa patogen tidak dapat berkembang biak. BAL juga dapat menghasilkan asam lemak rantai pendek, yang berperan dalam merangsang proliferasi sel epitel usus, sehingga meningkatkan penyerapan nutrisi dalam tubuh (Irianto, 2007).

Beberapa jenis bakteri asam laktat (Sumianti, 2008) antara lain sebagai berikut:

1. *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis* dan *Streptococcus cremoris*.

Ini adalah bakteri bulat gram positif (kokus) yang muncul dalam bentuk rantai dan memiliki nilai ekonomi penting dalam industri susu. *Streptococcus thermophilus* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk bulat, tidak berspora, tidak bergerak, anaerob fakultatif, dan katalase negatif. Kondisi terbaik untuk pertumbuhannya adalah pH 6,8 dan suhu 37°C.

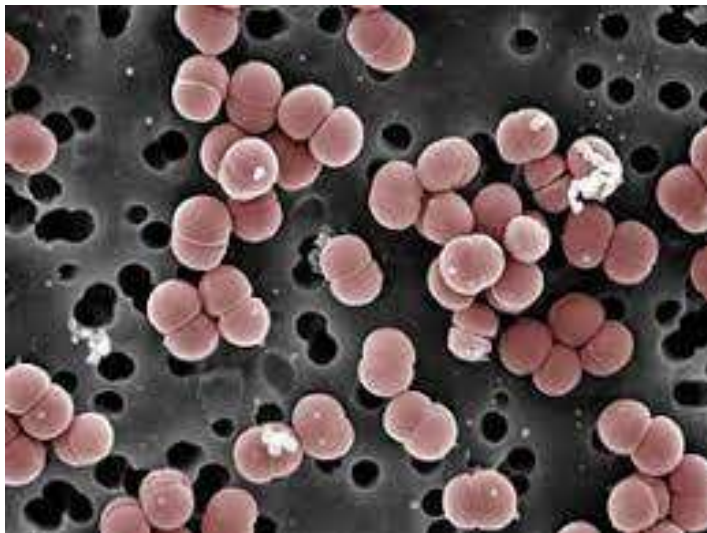
Bakteri termofilik memiliki karakteristik yang sama yaitu lakmus kuat, intoleransi garam dan tahan panas (kemampuan bertahan pada suhu tinggi). Bakteri thermoduric tumbuh paling baik pada suhu 20-37°C, dan suhu pertumbuhan minimum adalah 5-10°C. Menurut kebutuhan oksigen mereka, bakteri ini diklasifikasikan sebagai anaerob fakultatif (mereka dapat hidup dengan atau tanpa oksigen) (Richard Hendarto et al., 2021).



Gambar 5. *Streptococcus thermophilus* (therascience.com)

2. *Pediococcus cerevisiae*

Bakteri ini berbentuk bulat, bakteri Gram-positif, biasanya berpasangan atau berempat (tetrad). Meski spesies ini tergolong perusak bir dan anggur, bakteri ini berperan penting dalam fermentasi daging dan sayuran.



Gambar 6. *Pediococcus cerevisiae*
(brewersjournal.info)

3. *Leuconostoc mesenteroides* dan *Leuconostoc dextranicum*.

Bakteri ini berbentuk bulat Gram-positif dan muncul berpasangan atau berantai pendek. Bakteri ini berperan dalam penghancuran larutan gula dengan menghasilkan pertumbuhan glukukan yang kental. Namun, bakteri ini adalah spesies penting yang memulai fermentasi tanaman dan juga terdapat dalam jus buah, anggur, dan makanan lainnya. *L. mesenteroids* diklasifikasikan sebagai bakteri asam laktat heterofermentasi Gram-positif. Karakteristik morfologi sel berbentuk bola, anaerobik fakultatif, sel-sel bergerak. Bakteri ini diklasifikasikan sebagai katalase negatif, mereka tidak membentuk spora, nutrisi organik kimia, dan optimal kisaran suhu untuk pertumbuhan mereka adalah antara 20°C dan 30°C.

4. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*

Organisme ini merupakan bakteri gram positif berbentuk batang yang umumnya membentuk pasangan sel dan rantai. Spesies ini umumnya lebih toleran terhadap kondisi asam daripada *Pediococcus* atau *Streptococcus* dan karena itu lebih umum pada sayuran. Bakteri asam laktat, seperti *Lactobacillus lactis* dan *Lactobacillus brevis*, dapat ditemukan pada ternak lain, seperti di Bali.

Lactococcus memiliki status "GRAS" (umumnya dianggap aman), sehingga tidak berbahaya bagi kesehatan manusia dan hewan. *Lactococcus* adalah bakteri gram positif homofermentatif, mikroaerob, yang tumbuh pada suhu 10 oC tetapi tidak tumbuh pada suhu 45 °C, menghasilkan asam laktat L (+) dari glukosa. *Lactococcus* memiliki sel bulat, yang muncul sendiri-sendiri, berpasangan, atau berantai. Bakteri dalam kelompok ini telah menjadi probiotik. Probiotik memiliki beberapa mekanisme aksi, seperti memproduksi asam lemak rantai

pendek dan bakteriosin, menurunkan pH saluran pencernaan, bersaing untuk nutrisi, dan merangsang fungsi penghalang dan regulasi kekebalan. Manusia telah menggunakan BAL sejak lama, yaitu dalam proses fermentasi makanan. BAL merupakan kelompok besar bakteri menguntungkan dengan karakteristik yang relatif sama. Saat ini, bakteri asam laktat digunakan untuk memperbaiki tekstur dan rasa makanan.

5.2. Karakteristik Bakteri Asam Laktat

Karakteristik bakteri asam laktat dapat digolongkan sebagai probiotik, yaitu zat yang tidak berbahaya yang dapat bertahan selama pemrosesan dan penyimpanan, memiliki efek antagonis terhadap bakteri patogen, tahan terhadap asam lambung, getah pankreas dan empedu, serta dapat melindungi epitel inangnya. Ciri khas dari BAL adalah bahwa ia sedikit lebih besar dari bakteri lain dan biasanya memiliki bentuk mikroskopis oval, seperti batang, bulat atau koma. Semua BAL adalah bakteri Gram-positif, yang berarti mereka memiliki dinding peptidoglikan yang terdiri dari peptida (asam amino) dan glikan (karbohidrat).

Umumnya BAL merupakan bakteri yang hanya dapat tumbuh dengan baik pada media yang kompleks dan melimpah (fastidious). Oleh karena itu produksi bakteriosin dari BAL membutuhkan media fermentasi yang kompleks. Selain itu, bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti pH dan suhu fermentasi. BAL merupakan bakteri yang heterogen, gram positif, anaerobik, tidak berspora, dan tahan asam. BAL dapat memfermentasi berbagai nutrisi, termasuk homofermentasi dan heterofermentasi, terutama untuk produksi asam laktat, selain asam asetat, asam format, etanol, dan produksi CO₂. BAL terdapat secara alami pada tumbuhan, daging, susu dan produk olahannya, serta pada biji-bijian fermentasi dan makanan fermentasi yang telah digunakan dalam

industri makanan skala besar atau industri dalam negeri sejak lama. BAL digunakan sebagai starter untuk fermentasi sayuran atau daging. Bakteri ini juga dapat mengontrol pertumbuhan bakteri patogen dengan memproduksi asam organik, hidrogen peroksida, diasetil, dan bakteriosin.

BAL memiliki beberapa keunggulan, yaitu:

1. BAL dapat menghasilkan senyawa yang memberikan rasa dan aroma tertentu pada makanan fermentasi.
2. BAL dapat meningkatkan nilai pencernaan makanan fermentasi karena dapat memotong bahan makanan yang sulit dicerna sehingga dapat langsung diserap oleh tubuh. seperti konversi protein menjadi peptida dan asam amino

Bakteri asam laktat akan menghasilkan asam laktat, dan asam laktat akan terakumulasi di lingkungan sekitarnya, menyebabkan mikroorganisme penyebab penyakit dan pembusuk yang umumnya hidup pada kisaran toleransi pH yang lebih tinggi gagal untuk tumbuh. BAL juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain seperti bakteri pembusuk dan patogen pada makanan dan produk fermentasi lainnya. Fitur yang paling penting dari BAL adalah kemampuannya untuk membentuk kembali senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana untuk menghasilkan asam laktat. Produk asam dari bakteri asam laktat berjalan dengan cepat dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme berbahaya lainnya. *Salmonella* dan *Staphylococcus aureus* serta bakteri patogen lain yang terdapat pada makanan akan dapat ditekan jika terdapat flora lain yang tergolong bakteri asam laktat, yaitu famili *Lactobacillus*. Fitur lainnya adalah dapat menghasilkan agen antibakteri. Beberapa diantaranya telah diketahui karakteristiknya, namun banyak yang masih ditentukan dari spesies atau galur, serta unsur hara, karakteristik fisik, dan suasana kimiawi areal tanam.

BAL berperan sebagai penghasil senyawa antibakteri melalui metabolitnya seperti asam organik, bakteriosin, H_2O_2 , CO_2 dan diasetil.

Agen antibakteri ini dapat mencegah atau membunuh mikroorganisme tertentu, seperti jamur, kapang, bakteri vegetatif, spora, dan bahkan virus. Aktivitas antimikroba bervariasi sesuai dengan hasil metabolisme masing-masing. Agen antimikroba adalah antibodi yang dapat bereaksi dengan racun dan menetralkannya. Zat antibakteri adalah fungisida (membunuh bakteri), fungisida (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisida (membunuh jamur), fungisida (menghambat pertumbuhan jamur) dan fungisida (menghambat pertumbuhan spora bakteri) Perkecambahan). Efektivitas BAL dalam menghambat bakteri pembusuk dipengaruhi oleh kepadatan BAL, strain BAL, dan komposisi media.

Selain itu, produksi substansi penghambat dari BAL dipengaruhi oleh media pertumbuhan, pH, dan temperatur lingkungan. BAL mengalami peningkatan pertumbuhan dengan meningkatnya waktu inkubasi yang berlangsung secara logaritmik. Meningkatnya jumlah biomassa menyebabkan jumlah antimikroba yang dihasilkan semakin meningkat kemudian tetap setelah mencapai fase stasioner. BAL merupakan kelompok bakteri yang paling banyak menghasilkan bakteriosin. Secara umum, bakteriosin yang disekresikan oleh BAL merupakan peptida kationik kecil dengan 30 sampai 60 residu asam amino dan tahan terhadap pemanasan (Sivaramakrishnan et al., 2020). Selain dimanfaatkan dalam bidang pangan, bakteri asam laktat juga memiliki efek fisiologis bagi kesehatan, seperti suplemen (makanan dan minuman), obat-obatan (seperti antibiotik alami) dan efek terapeutik (seperti hipokolesterolemia, antihipertensi dan pencegahan diare). BAL disebut probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme hidup, asupan yang cukup dapat membawa manfaat kesehatan bagi inangnya.

Syarat BAL sebagai probiotik yang dikemukakan oleh (Chang et al., 2010) yaitu;

1. Tahan terhadap pH asam lambung (1.5-4)
2. Stabil terhadap garam empedu
3. Memproduksi senyawa antimikroba
4. Mampu menempel pada sel usus manusia serta tumbuh dan berkembang baik dalam saluran pencernaan, dan
5. Dapat berkoagregasi membentuk lingkungan mikroflora normal yang seimbang dalam saluran pencernaan. Kemampuan BAL untuk hidup di dalam saluran pencernaan dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen sehingga bisa dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan saluran pencernaan. Inilah alasannya BAL berpotensi sebagai probiotik.

BAL juga dapat tumbuh dan berkembang sebagai bagian dari proses fermentasi terus menerus, dan sampai batas tertentu menunjukkan ketahanan terhadap kondisi fisiologis media asam atau alkohol, seperti pada fermentasi biji kakao. BAL juga dapat bertahan dalam kondisi lingkungan kering atau kelembaban relatif rendah. BAL dapat bertahan dalam media tinggi lemak. Karena adanya protein tahan panas dalam sel bakteri yang dapat melindungi BAL dari kerusakan panas, beberapa BAL telah terbukti mampu menahan proses pemanasan suhu sedang dan rendah, seperti blansing dan pasteurisasi. Di sisi lain, BAL juga mengandung protein yang dapat melindungi diri dari pengaruh suhu lingkungan yang rendah. Di dalam tubuh, bakteri asam laktat dapat bertahan hidup di sistem pencernaan pada pH ekstrim, dan pH asam lambung adalah $1,5 \pm 0,5$. Kemampuan ini memungkinkan BAL untuk bertahan hidup dan kemudian tumbuh di perut manusia dan hewan untuk menghambat bakteri patogen.

5.3 Sumber-Sumber Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat terdapat pada buah dan sayuran segar, makanan fermentasi yang berasal dari hewan dan tumbuhan, tumbuhan, saluran reproduksi manusia dan hewan, saluran pencernaan dan saluran pernapasan. Bakteri asam laktat disebut bakteri non-patogen, dan fungsinya dalam industri makanan lebih banyak keuntungan daripada kerugiannya. Dalam proses fermentasi makanan, bakteri asam laktat tidak hanya memberikan rasa dan cita rasa tertentu, tetapi juga dapat memberikan keamanan pangan untuk produk akhir yang berasal dari asam laktat dan asam organik lainnya akibat metabolisme selama proses fermentasi. Asam yang dihasilkan akan menurunkan pH dan membuat lingkungan tidak cocok untuk pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen. Selain asam organik, beberapa bakteri asam laktat juga dapat menghasilkan berbagai komponen yang memiliki efek antagonis terhadap bakteri lain, seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, diacetyl dan sebagainya. Meskipun bakteri asam laktat yang ditemukan dalam makanan umumnya tidak bersifat patogen, beberapa spesies streptokokus bersifat patogen bagi manusia.

Secara ekologis, kelompok bakteri asam laktat ini telah diisolasi dari berbagai macam jenis habitat yang anggota spesiesnya dapat mendominasi macam-macam habitat seperti tanaman, jerami, sayuran, produk susu, produk daging, rongga mulut maupun perut hewan.

Bakteri asam laktat diisolasi untuk menghasilkan antimikroba yang dapat digunakan sebagai probiotik. Fermentasi asam laktat yang memanfaatkan bakteri asam laktat yang biasanya dilakukan untuk mengolah beberapa jenis makanan, mulai dari susu, biji-bijian, hingga buah dan sayuran. Cara paling sederhana untuk melakukan fermentasi asam laktat adalah dengan mencuci makanan yang mengandung bakteri asam laktat alami, seperti kol atau

mentimun, lalu merendamnya di dalam air garam. Setelah itu, makanan tersebut disimpan di dalam wadah bersih yang tertutup rapat.

Ada beberapa alasan mengapa fermentasi asam laktat dipilih sebagai salah satu metode untuk mengawetkan makanan, di antaranya :

1. Memerlukan biaya yang lebih rendah dibandingkan membekukan atau mengalengkan makanan
2. Memperkaya rasa, tekstur, dan aroma makanan
3. Mencegah pertumbuhan mikroorganisme berbahaya dan pembusukan makanan
4. Membuat makanan lebih awet dan lebih lama disimpan
5. Membuat makanan menjadi lebih mudah dicerna

Berikut ini adalah beberapa jenis makanan yang dihasilkan dari proses fermentasi asam laktat :

1. Kimchi

Kimchi adalah makanan tradisional asal Korea yang terbuat dari sayuran yang difermentasi oleh bakteri *Lactobacillus kimchii*. Sayuran yang umum diolah menjadi kimchi adalah sawi putih, lobak, dan mentimun. Namun, ada ratusan jenis sayuran yang juga bisa diolah sebagai kimchi.

Makanan hasil fermentasi asam laktat ini baik untuk kesehatan. Kimchi diketahui dapat melancarkan dan menjaga kesehatan sistem pencernaan, memperkuat sistem kekebalan tubuh, mengurangi peradangan, memperlambat penuaan, hingga menjaga kesehatan jantung dan otak.

2. Tempe

Fermentasi asam laktat juga berperan penting dalam produksi tempe. Tempe merupakan makanan hasil fermentasi dari kacang kedelai oleh bakteri *Lactobacillus plantarum* dan jamur *Rhizopus oligosporus*.

Tempe mengandung protein dan vitamin B12 yang diperoleh dari proses fermentasi. Makanan khas Indonesia ini baik untuk menjaga kesehatan sistem pencernaan, memelihara kesehatan dan fungsi jantung, menguatkan tulang, serta menurunkan kadar kolesterol dan tekanan darah.

3. Miso

Miso merupakan bumbu makanan Jepang yang dihasilkan oleh fermentasi jamur *Aspergillus oryzae* dan *Lactobacilli acidophilus* pada kacang kedelai.

Makanan ini juga memiliki manfaat untuk kesehatan, yaitu mengurangi risiko terjadinya kanker dan stroke serta dapat meningkatkan kesehatan jantung dan otak.

4. Yoghurt

Yoghurt adalah makanan dengan kandungan probiotik yang terbuat dari susu yang difermentasi dengan bakteri asam laktat.

Makanan hasil fermentasi susu ini diduga dapat menyembuhkan diare akibat infeksi bakteri di saluran pencernaan, meringankan gejala *irritable bowel syndrome*, meningkatkan kesehatan dan kekuatan tulang, serta menjaga tekanan darah tetap stabil.

5. Acar

Acar umumnya terbuat dari mentimun yang difermentasi dalam campuran air dan garam selama beberapa waktu dan terasa asam. Rasa asam pada acar timbul karena bakteri asam laktat yang tumbuh secara alami.

Selain kaya akan bakteri probiotik, acar adalah sumber vitamin K dan rendah kalori. Meski demikian, acar yang dibuat menggunakan cuka tidak mengandung bakteri probiotik hidup.

6. Sayur asin atau *sauerkraut*

Sauerkraut adalah kol parut yang telah difermentasi oleh bakteri asam laktat dan memiliki rasa yang menyerupai sayur asin, namun lebih asam.

Sauerkraut mengandung serat, probiotik, vitamin C, vitamin B, vitamin K, sodium, zat besi, dan mangan. Selain itu, *sauerkraut* juga mengandung antioksidan lutein dan *zeaxanthin* yang penting untuk kesehatan mata.

Di samping makanan-makanan di atas, ada banyak makanan dan minuman lain yang diolah dengan fermentasi asam laktat, antara lain kefir, kombucha, dan beberapa jenis keju.

BAB 6

PREBIOTIK

6.1 Definisi Prebiotik

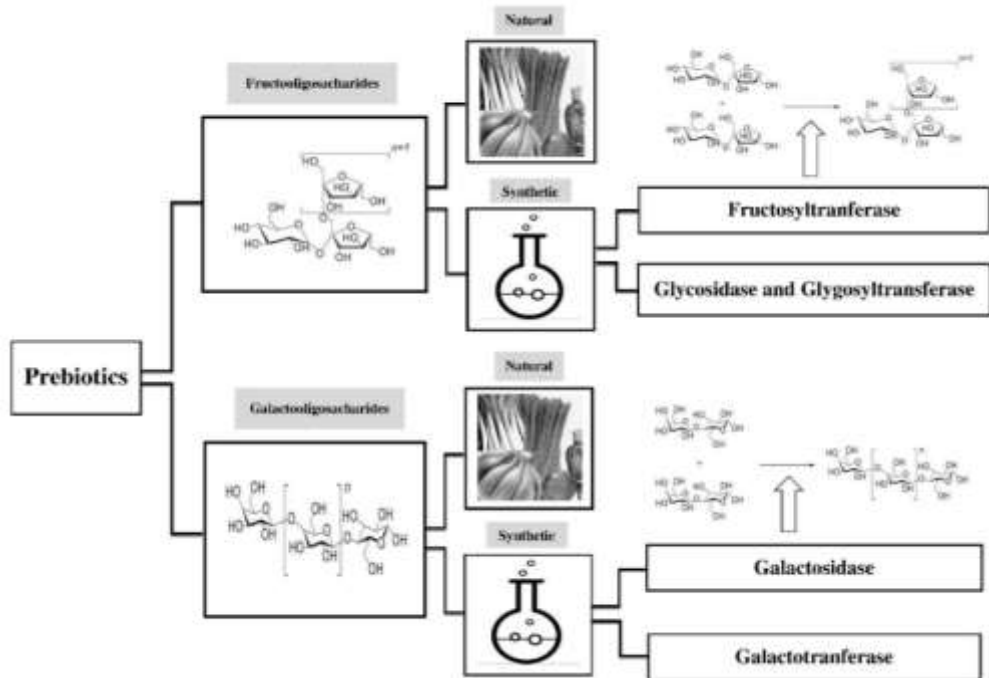
Konsep prebiotik pertama kali diperkenalkan pada tahun 1995 oleh Glenn Gibson dan Marcel Roberfroid. Prebiotik digambarkan sebagai "bahan makanan yang tidak dapat dicerna yang secara menguntungkan mempengaruhi inang dengan secara selektif merangsang pertumbuhan dan / atau aktivitas satu atau sejumlah bakteri di usus besar, dan dengan demikian meningkatkan kesehatan inang". Definisi ini hampir tidak berubah selama lebih dari 15 tahun. Menurut definisi ini, hanya beberapa senyawa dari kelompok karbohidrat, seperti: fructans rantai pendek dan panjang [FOS dan inulin], laktulosa, dan GOS, dapat diklasifikasikan sebagai prebiotik.

Pada tahun 2008, Pertemuan ke-6 Asosiasi Ilmiah Internasional Probiotik dan Prebiotik (ISAPP) mendefinisikan "prebiotik diet" sebagai "bahan fermentasi selektif yang menghasilkan perubahan spesifik dalam komposisi dan / atau aktivitas mikrobiota gastrointestinal, sehingga memberikan manfaat pada kesehatan inang nya" (Davani-Davari et al., 2019).

6.2 Sumber Probiotik

Prebiotik memainkan peran penting dalam kesehatan manusia. Mereka secara alami ada dalam berbagai produk makanan diet, termasuk asparagus, bit gula, bawang putih, sawi putih, bawang merah, artichoke Yerusalem, gandum, madu, pisang, barley, tomat, gandum hitam, kedelai, susu manusia dan sapi, kacang polong, kacang-kacangan, dll., dan baru-baru ini, rumput laut dan mikroalga. Karena konsentrasinya yang rendah dalam makanan, mereka diproduksi dalam skala besar industri. Beberapa prebiotik diproduksi

dengan menggunakan laktosa, sukrosa, dan pati sebagai bahan baku. Karena sebagian besar prebiotik diklasifikasikan sebagai GOS dan FOS dalam skala industri, ada banyak penelitian yang relevan tentang produksinya.



Gambar 7 Sumber dan produksi prebiotik utama, termasuk frukto-oligosakarida (FOS) dan galakto-oligosakarida (GOS). Prebiotik ada dalam makanan manusia dalam konsentrasi kecil. Karena mereka memiliki peran penting dalam pemeliharaan kesehatan, mereka diproduksi dalam skala besar industri (Davani-Davari et al., 2019).

a. FOS (Fruktooligosakarida)

FOS tersedia dalam beberapa makanan seperti pisang, bawang putih, bawang merah, tomat, gandum, asparagus, artichoke, daun bawang, madu, gandum hitam, gula merah, barley, triticale, bir, selada, sawi putih,

burdock, bit, apel, umbi seperti merah lili, yacon, dan oat, dengan bawang bombay sebagai makanan dengan tingkat FOS tertinggi.

Tabel 2. Jumlah FOS (%) per 100g mentah di beberapa makanan alami (Sridevi et al., 2014).

Makanan	Persentasi
Akar chicory	22.9 g
Artichoke Yerusalem	13.5 g
Dandelion hijau	10.8 g
Bawang putih	5 g
Bawang perai	5.2 g
Asparagus	2.5 g
Pisang	0.5 g

FOS dapat disintesis secara kimia dengan menggunakan glikosidase dan glikosil-transferase. Senyawa yang digunakan dalam reaksi ini berbahaya dan mahal, dan konsentrasi produk akhir (FOS) sangat rendah. Dengan demikian, tidak dapat diproduksi dalam skala industri. Fruktosil-transferase (FTase) adalah enzim kunci dalam memproduksi FOS. FTase menghasilkan FOS dari sukrosa dengan mentransfer satu hingga tiga molekul fruktosa. Beberapa mikroorganisme memiliki FTase, seperti *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Penicillium* sp., *Arthrobacter* sp., *Zymomonas mobilis*, *Bacillus macerans*, *Candida*, *Kluyveromyces*, dan *Saccharomyces cerevisiae*. Di antara mikroorganisme ini, *Aspergillus niger* dan *Aureobasidium pullulans* paling banyak digunakan di industri. Untuk produksi FOS, seluruh sel mikroorganisme atau enzim bebas dapat digunakan.

Ada berbagai faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi FOS yang dihasilkan. Jumlah maksimum FOS yang dihasilkan oleh FTase tergantung pada konsentrasi awal sukrosa (secara teoritis sekitar 55-60%). Glukosa, yang merupakan produk sampingan dari fermentasi,

menghambat trans-glikosilasi. Oleh karena itu, menghilangkan residu glukosa dan sukrosa merupakan langkah penting untuk mencapai hasil fermentasi FOS yang lebih tinggi. Beberapa ilmuwan mengklaim memanfaatkan glukosa oksidase dan fructofuranosidase untuk meningkatkan hasil produksi FOS. fructofuranosidase mampu mengubah sukrosa menjadi FOS. Glukosa yang dihasilkan selama fermentasi FOS diubah menjadi asam glukonat oleh glukosa oksidase. Tidak seperti glukosa, asam glukonat dapat dihilangkan dengan resin penukar ion atau dengan koagulasi dengan kalsium karbonat (CaCO₃). Dengan demikian, pemanfaatan kedua enzim tersebut meningkatkan hasil pembentukan FOS hingga 98%. Fructofuranosidase dan glukosa oksidase masing-masing dapat diturunkan dari *Apostichopus japonicus* dan *A. niger*. Glukosa dapat dipisahkan dari FOS melalui metode nanofiltrasi. Proses ini meningkatkan produksi FOS hingga 90%. *S. cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* mampu menghilangkan sakarida kecil, seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa, dengan mengubah sakarida menjadi karbon dioksida dan etanol. *S. cerevisiae* tidak dapat memfermentasi oligosakarida dengan empat atau lebih unit monosakarida. Sorbitol dan FOS juga diproduksi dalam jumlah kecil selama fermentasi sukrosa oleh *Z. mobilis*.

b. GOS (Galaktooligosakarida)

Galacto oligosaccharides (GOS) yang ada dalam susu, adalah komponen yang paling relevan untuk efek prebiotik ASI. Oligosakarida yang mengandung galaktosa dalam bentuk Glu 1-4[β Gal 1-6]_n di mana n=2-5, disebut galaktooligosakarida dan terdapat baik dalam susu manusia maupun susu sapi. GOS diproduksi dari laktosa oleh aksi beta-galaktosidase yang memiliki aktivitas transgalaktosilasi dan produksi GOS dapat ditingkatkan dengan mencampur glukosa oksidase dan

galaktosidase. Satu atau lebih unit d-galaktosil pada bagian galaktosa laktosa yang digunakan untuk memproduksi GOS oleh beta-galaktosidase selama hidrolisis ikatan galaktosida laktosa. Keterkaitan antara unit galaktosa, efisiensi transgalaktosilasi, dan komponen dalam produk akhir bergantung pada enzim dan kondisi yang digunakan dalam reaksi (Hingu & Shah, 2013).

6.3. Peran Probiotik Terhadap Pertumbuhan Probiotik

Campuran probiotik dan prebiotik yang menguntungkan mempengaruhi inang dengan meningkatkan kelangsungan hidup dan implantasi suplemen makanan mikroba hidup di saluran pencernaan, dengan selektif merangsang pertumbuhan dan/atau dengan mengaktifkan metabolisme satu atau sejumlah terbatas bakteri yang meningkatkan kesehatan, dan dengan demikian meningkatkan kesejahteraan tuan rumah, di definisikan sebagai Sinbiotik.

Berdasarkan definisi ini, efek sinergis probiotik dipilih berdasarkan efek pada inang, sedangkan prebiotik dipilih untuk secara khusus merangsang pertumbuhan dan aktivitas probiotik. Efek komplementer adalah ketika probiotik dipilih berdasarkan efek spesifik pada inang, dan prebiotik dipilih secara independen untuk secara selektif meningkatkan konsentrasi komponen mikrobiota. Prebiotik dapat meningkatkan pertumbuhan dan aktivitas probiotik, tetapi hanya secara tidak langsung sebagai bagian dari kisaran targetnya.

Mengingat fakta bahwa probiotik pada dasarnya aktif di usus kecil dan besar, dan efek prebiotik diamati terutama di usus besar, kombinasi keduanya mungkin memiliki efek sinergis. Prebiotik sebagian besar digunakan sebagai media selektif untuk pertumbuhan strain probiotik, fermentasi, dan saluran usus. Ada indikasi dalam literatur bahwa, karena penggunaan prebiotik, mikroorganisme probiotik memperoleh toleransi yang

lebih tinggi terhadap kondisi lingkungan, termasuk: oksigenasi, pH, dan suhu di usus organisme tertentu. Namun, mekanisme kerja sumber energi ekstra yang memberikan toleransi lebih tinggi terhadap faktor-faktor ini tidak cukup dijelaskan. (Markowiak & Ślizewska, 2017).

Stimulasi probiotik dengan prebiotik menghasilkan modulasi aktivitas metabolisme di usus dengan pemeliharaan biostruktur usus, pengembangan mikrobiota yang bermanfaat, dan penghambatan patogen potensial yang ada di saluran pencernaan. Sinbiotik menghasilkan penurunan konsentrasi metabolit yang tidak diinginkan, serta inaktivasi nitrosamin dan zat kanker. Penggunaannya menyebabkan peningkatan signifikan kadar asam lemak rantai pendek, keton, karbon disulfida, dan metil asetat, yang berpotensi menghasilkan efek positif pada kesehatan inang. Adapun kemanjuran terapeutiknya, sifat sinbiotik yang diinginkan termasuk efek antibakteri, antikanker, dan anti-alergi. Mereka juga melawan proses pembusukan di usus dan mencegah sembelit dan diare. Ternyata sinbiotik mungkin sangat efisien dalam pencegahan osteoporosis, pengurangan lemak darah dan kadar gula, pengaturan sistem imunologi, dan pengobatan gangguan otak yang berhubungan dengan fungsi hati yang abnormal.

BAB 7

BAKTERIOSIN

7.1 Klasifikasi Bakteriosin

Munculnya berbagai bakteri resisten antibiotik dan melambatnya penemuan antibiotik baru berpotensi menjadi permasalahan masyarakat yang serius saat ini. Bakteri resisten antibiotik ini utamanya disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang berlebihan dalam jangka waktu yang lama, sehingga memungkinkan bakteri patogen untuk beradaptasi dengan antibiotik yang kemudian akan mengurangi aktivitasnya. Selain itu, penyebaran dari orang ke orang, dari ternak atau bahkan dari makanan hewan yang ditambahkan dengan antibiotik yang sama dengan antibiotik yang digunakan oleh manusia, telah menjadi faktor utama dalam penyebaran resistensi antibiotik. Karena hilangnya efisiensi antibiotik tersebut, para peneliti terus berusaha untuk mengidentifikasi jenis molekul dan strategi terapeutik yang baru.

Dari sudut pandang kualitas dan keamanan pangan, munculnya patogen baru, diversifikasi sumber pangan, dan kebiasaan makan baru konsumen yang cenderung semakin memilih produk makanan yang lebih segar dan lebih “alami”, tanpa pengawet atau garam, merupakan tantangan global saat ini. Oleh karena itu untuk menjamin mutu dan keamanan produk pangan, menjaga daya saing peternakan dan membatasi residu antibiotik, perlu dicari bahan pengganti bahan aditif pangan dan antibiotik.

Kemajuan dalam identifikasi bakteriosin dan karakterisasinya telah mendorong minat dalam penggunaan molekul-molekul ini baik sebagai aditif makanan baru atau agen terapeutik. Peptida atau protein antimikroba ini diproduksi oleh bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, dan efektivitasnya,

serta strain produsennya, dalam hal menghambat banyak pembusukan makanan dan bakteri patogen, telah ditunjukkan dalam berbagai sumber makanan, termasuk keju, daging, dan sayuran. Selain itu, efektifitas banyak bakteriosin dengan potensi untuk mengobati infeksi manusia dan hewan telah dijelaskan dalam berbagai laporan penelitian.

Beberapa bakteriosin telah terbukti efektif melawan banyak bakteri patogen, namun bakteriosin yang paling banyak digunakan dalam industri makanan adalah nisin. Hal ini sebagian karena kurangnya informasi ilmiah yang rinci mengenai keamanan bakteriosin yang telah diisolasi dan dampaknya terhadap kesehatan hewan dan manusia jika digunakan secara oral (Soltani et al., 2021).

Sebagian besar bakteriosin bakteri asam laktat (BAL) berukuran molekul kecil (<10 kDa), kationik, stabil terhadap panas, amfifilik dan mampu menembus membrane permeable. Bakteriosin diklasifikasi menjadi 3 kelas, yaitu:

1. Kelas 1, Lantibiotik

Kelas 1 Lantibiotik adalah peptide yang mengandung karakteristik asam amino polisiklik lantihonine atau methyllanthionine, serta asam amino tak jenuh dehydroalanine dan asam-2-amino iso butirat. Bakteriosin ini lebih lanjut dibagi menjadi dua jenis berdasarkan kesamaan struktur. Tipe A terdiri dari molekul yang relatif memanjang, berbentuk sekrup, bermuatan positif, amfipatik dan fleksibel. Berat molekul berkisar 2 sampai 4 kDa dan mekanisme kerjanya adalah melalui pembentukan pori melalui depolarisasi membrane spesies target. Nisin dan lactivin 3145 adalah contoh kelompok ini. Lantibiotik tipe B berstruktur globular dan mekanismenya dengan cara mengganggu reaksi enzimatik sel. Berat molekul terletak antara 2 hingga 3 kDa dan tidak memiliki muatan.

2. Kelas II, non lantibiotik

Bakteriosin kelas II juga berukuran kecil (< 10 kDa), relative stabil terhadap panas dan tidak mengandung lanthionine. Bakteriosin ini dibagi menjadi 2 subkelas. Subkelas IIa, yaitu subkelas bakteriosin aktif seperti pediocin dan bakteriosin yang aktif terhadap *Listeria*, dan memiliki urutan Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Subkelas IIa ini juga disebut sebagai bakteriosin anti listerial, contohnya adalah Pediocin PA1. Subkelas IIb mengacu pada bakteriosin dua komponen (dua peptida terpisah) dan untuk menghasilkan aktivitas antimikroba peptide tersebut harus bekerja secara sinergis. Contoh bakteriosin kelas ini adalah Lactacin F dan Lactococcin G.

3. Kelas III Bakteriosin

Kelas ini terdiri dari bakteriosin yang labil terhadap panas dan pada umumnya memiliki berat molekul yang besar (> 30 kDa). Kelas bakteriosin yang ini belum banyak diteliti. Bakteriosin yang mewakili kelas ini adalah helveticin 1 yang dihasilkan oleh *Lactobacillus helveticus* dan enterolysin yang diproduksi oleh *Enterococcus faecium* (Zacharof & Lovitt, 2012).

7.2 Aplikasi Bakteriosin

1. Industri Makanan

Sebagai agen antimikroba alami, bakteriosin merupakan alternative yang menarik untuk pengawet kimia dalam hal memenuhi permintaan konsumen yang meningkat akan makanan yang aman dan siap makan dengan proses minimum. Karena bakteriosin tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa, bakteriosin dapat dimasukkan kedalam produk makanan tanpa mengubah sifat organoleptiknya. Selain itu beberapa bakteriosin stabil pada suhu tinggi, pH rendah dan berbagai konsentrasi garam. Penggunaan bakteriosin sebagai pengawet makanan menawarkan beberapa keuntungan yaitu : 1) memperpanjang umur simpan makanan, 2) memberikan perlindungan ekstra

selama proses pengolahan yang mungkin terjadi fluktuasi suhu, 3) mengurangi risiko penularan makanan-patogen yang terbawa melalui rantai kajan, 4) mengurangi kerugian ekonomi akibat pembusukan makanan.

Nisin adalah satu-satunya bakteriosin yang dilisensikan sebagai biopreservatif dan digunakan secara komersil dengan nama dagang Nisaplin dan Chrisin. Bakteriosin ini banyak digunakan dalam industri susu untuk mengontrol *Clostridium* dan kontaminasi pasca-pemrosesan dari *Listeria*. Nisin juga telah diketahui menghambat beberapa patogen atau bakteri pembusuk dalam berbagai produk makanan, seperti produk daging, ikan, makanan laut, jus dan minuman, buah-buahan, sayuran serta sereal.

Bakteriosin dapat ditambahkan ke dalam produk makanan sebagai senyawa semi murni atau dalam bentuk bubuk bioaktif, seringkali mengandung campuran senyawa antimikroba (bakteriosin, asam organik, dll). Bubuk tersebut biasanya diperoleh dengan mengkultur strain produsen dalam media yang sesuai, diikuti oleh pengeringan media. Serbuk bioaktif komersial yang dapat ditemukan di pasaran antara lain MicroGard dan produk DuraFresh yang efektif melawan ragi, jamur dan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Bakteriosin juga dapat dimasukkan kedalam film kemasan makanan untuk menghambat pembusukan atau pertumbuhan mikroorganisme patogen selama periode penyimpanan produk makanan.

Nisin digunakan dilebih dari 48 negara dan telah disetujui oleh FDA (*Food and Drug Administration*). Salah satu produk komersil Nisin adalah Nisaplin, yang dijual sebagai pelindung makanan alami. Produk ini efektif dalam menghambat pertumbuhan berbagai bakteri Gram positif, termasuk patogen yang terbawa makanan, seperti *Listeria monocytogenes*. Produk ini terutama digunakan dalam makanan kaleng dan produk susu dan sangat efektif digunakan dalam produksi keju olahan dimana produk ini dapat

melindungi makanan dari organisme yang tahan panas dan dapat membentuk spora, seperti *Bacillus* dan *Clostridium*. Hal ini sangat penting untuk mencegah infeksi *Clostridium botulinum* yang dapat menimbulkan infeksi serius dikarenakan toxin yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Bakteriosin juga dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas makanan dan sifat sensorik, misalnya, meningkatkan laju proteolisis atau dalam pencegahan cacat tiupan gas pada keju. Aplikasi bakteriosin lainnya adalah pengemasan bioaktif, suatu proses yang dapat melindungi makanan dari kontaminasi eksternal, yang meningkatkan keamanan pangan dan umur simpan (Negash & Tsehai, 2020).

2. Pengobatan Ulkus Peptikum

Ulkus peptikum disebabkan oleh ketidakseimbangan antara mekanisme pertahanan mukosa gastroduodenal dan kekuatan merusak asam lambung dan pepsin, dikombinasikan dengan lesi yang tumpang tindih dari agen lingkungan atau imunologis. Jumlah *Helicobacter pylori* anaerob berlebihan pada pasien dengan tukak lambung dan duodenum. Berdasarkan profil aktivitas antimikroba, bakteriosin diproduksi oleh *Pediococcus acidilactici* BA28 diusulkan untuk perumusan terapi perawatan pribadi topikal yang ditujukan untuk pencegahan dan pengobatan banyak penyakit manusia, khususnya tukak lambung.

3. Aktivitas Spermisida

Bakteriosin adalah agen spermisida potensial karena kemampuannya untuk mempengaruhi motilitas sperma. Fermentacin HV6b adalah peptida antimikroba kelas IIa yang diproduksi oleh *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC 10770 yang diisolasi dari ekosistem vagina manusia. Dapat menghambat pertumbuhan bakteri, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Staphylococci*, dan *Streptococci*, penyebab infeksi vagina pada manusia.

Fermentisin HV6b memiliki immobilisasi sperma yang unik dan aktivitas spermisida. Formulasi baru dengan *Lactobacillus fermentum* HV6b atau fermenticin HV6b dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan produksi krim vagina yang dapat melindungi vagina manusia dari infeksi mikroba dan juga bertindak sebagai kontrasepsi.

Bacillus amyloliquefaciens menghasilkan bakteriosin subtilosin, yang menghambat patogen vagina *Gardnerella vaginalis* tetapi bukan mikrobiota vagina normal yang sehat dan permukaan sel vagina itu sendiri. Konsentrasi yang berbeda (28,3–113,3 µg/ml) subtilosin diuji yang secara signifikan dapat mengurangi motilitas spermatozoa manusia. Bersama dengan sifat antimikroba, subtilosin telah terbukti menghilangkan motilitas dan perkembangan spermatozoa manusia ke depan dengan cara yang tergantung pada dosis dan, oleh karena itu, dapat dianggap sebagai spermisida yang umum. Oleh karena itu, subtilosin akan menjadi komponen berharga dalam produk perawatan pribadi topikal yang berfokus pada kontrasepsi dan profilaksis dan pengobatan BV.

4. Aktivitas Anti Kanker

Potensi penggunaan bakteriosin dalam terapi kanker adalah karena penghambatan sintesis DNA dan protein membran, yang menyebabkan apoptosis atau sitotoksitas pada sel tumor. Bakteriosin nisin dapat berfungsi sebagai terapi potensial baru untuk pengobatan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher (HNSCC), karena menginduksi apoptosis preferensial, siklus sel berhenti, dan mengurangi proliferasi sel dalam sel HNSCC, dibandingkan dengan keratinosit primer. Bakteriosin penting lainnya dari *Enterococcus mundtii* strain C4L10 dapat digunakan sebagai kemungkinan agen antimikroba dan untuk agen antiproliferatif dalam pengendalian kanker. Garis sel kanker, seperti kanker mulut HSC3, kanker

payudara MCF7, kanker paru-paru H1299, dan kanker usus besar HCT116, menunjukkan kerentanan terhadap bakteriosin tersebut.

5. Manfaat Dalam Peternakan

Penggunaan nisin sebagai obat pencegahan dan pengobatan mastitis pada sapi juga telah diteliti dalam industri kedokteran hewan. Bovine mastitis adalah penyakit yang memiliki dampak ekonomi besar pada industri susu global, karena merupakan penyebab utama kerugian ekonomi di kalangan peternak. Obat suntik berbahan dasar nisin telah dilaporkan dapat mengendalikan hampir 99,9% bakteri penyebab mastitis, seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae* setelah pemberian obat.

6. Perawatan kulit

Laporan ilmiah dan berbasis fakta memperkuat asumsi bahwa probiotik tertentu dapat berkontribusi untuk memodulasi mikroflora kulit, penghalang lipid, dan sistem kekebalan kulit, yang mengarah pada pemeliharaan homeostasis kulit. ESL5, bakteriosin yang diproduksi oleh *Enterococcus faecalis* SL-5, telah digunakan sebagai losion pada pasien dengan lesi inflamasi jerawat yang disebabkan oleh *Propionibacterium acnes*, yang secara signifikan mengurangi lesi inflamasi dan jerawat dibandingkan dengan losion placebo.

7. Perawatan mulut

Lactobacillus plantarum ACA-DC 269, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, dan *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 merupakan bakteri yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan patogen rongga mulut penyebab gangguan kesehatan rongga mulut. Macedocin yang dihasilkan dari *S. macedonicus* ACA-DC 198 mampu membunuh patogen oral pada fase lag dengan menyebabkan perubahan utama pada kimia seluler yang

dikonfirmasi dengan spektroskopi FTIR. Macedocin dapat menjadi bahan aktif dalam formulasi yang dikembangkan untuk aplikasi pasta gigi dan obat kumur.

Streptococcus mutans menyebabkan karies gigi yang menyebabkan pembusukan gigi. Studi pada nisin dan polylysine menunjukkan bahwa kedua senyawa bekerja pada flora mikroba mulut yang sama. Konsentrasi penghambatan parsial nisin (200 IU) dan polilisin (5 µg/ml) menunda pertumbuhan bakteri bila digunakan secara terpisah. Penggunaan gabungan dari mereka memiliki efek sinergis, menghambat pertumbuhan bakteri selama 24 jam. Formulasi yang mengandung 10 µg/ml polilisin dan 50 IU/ml nisin dapat sepenuhnya menghambat *S. mutans*, 250 µg/ml polilisin, dan 100 IU/ml nisin menghilangkan total flora oral aerobik. Formulasi potensial ini memiliki aplikasi dalam produksi produk perawatan mulut.

Halitosis tidak lain adalah bau mulut yang umum terjadi pada beberapa populasi orang dewasa. Ini menciptakan masalah yang signifikan dalam lingkungan sosial dan kerja. Umumnya, bau busuk ini disumbang oleh pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan seperti *Atopobium parvulum* ATCC33793, *Eubacterium sulci* ATCC35585, *Eubacterium saburreum* ATCC33271, *Parvimonas micra* ATCC33270, *Solobacterium moorei* CCUG39336, *Streptococcus anginosus* T-29, dan *Micromonas micros*. *Streptococcus salivarius* K12 diisolasi dari rongga mulut siswa sekolah sehat. Strain ini menghasilkan 2 bakteriosin, salivaricin A2 dan B. Salivaricins ditemukan menghambat *Streptococcus pyogenes*, yang menyebabkan faringitis. Bakteriosin dari *S. salivarius* K12 mampu menghambat pertumbuhan semua bakteri yang disebutkan di atas menyebabkan halitosis. Pengembangan formulasi baru yang mengandung strain K12, salivaricin, atau kombinasi keduanya patut dipertimbangkan.

Daftar Pustaka

- Al-mohanna, M. T. (2017). Bacterial introduction. *Research Gate, April*, 679–692. www.researchgate.net/publication/315948104
- Anonymous. (2019). *Laboratorium Mikrobiologi*. <http://www.poltekkes-denpasar.ac.id/kesehatanlingkungan/laboratorium-mikrobiologi/>
- Aryal, S. (2019). *Motility Test-Principle, Procedures, Uses and Interpretation*. <https://microbiologyinfo.com/motility-test/>
- Axelson. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. Wyoming CRC Press.
- Boschker, H. T. S., Vasquez-Cardenas, D., Bolhuis, H., Moerdijk-Poortvliet, T. W. C., & Moodley, L. (2014). Chemoautotrophic carbon fixation rates and active bacterial communities in intertidal marine sediments. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101443>
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2008). *Biology* (8th ed.).
- Chang, J. H., Shim, Y. Y., Cha, S. K., & Chee, K. M. (2010). Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 220–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 1–27. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Hassan, N. P. (2020). *API (Analytical Profile Index) KIT dan 16S rRNA dalam identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL)*.
- Hingu, M. N., & Shah, H. S. (2013). Review: Role of galactooligosaccharides as prebiotic. *The Microbes*, 5(August 2013), 15–29.
- Irianto. (2007). *Mikrobiologi (menguak Dunia Mikroorganisme)*. CV Yrama Widya.
- Johnston, M. O. (2006). Mutations and New Variation: Overview. *Encyclopedia of Life Sciences, January 2006*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004165>
- Juriah, S., & Sari, W. P. (2018). Jurnal Analisis Kesehatan Klinikal Sains. *Klinikal Sains*, 6(1), 24–29. <http://jurnal.univrab.ac.id/index.php/klinikal/article/view/525/361>
- Lau, N. S., Matsui, M., & Abdullah, A. A. A. (2015). Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed Research International*, 2015(October). <https://doi.org/10.1155/2015/754934>
- Lusi, E., & Solikah. (2019). *Teknik Isolasi atau Penanaman Mikroba*.

- <http://farmasi.unida.gontor.ac.id/2019/03/24/teknik-teknik-isolasi-atau-penanaman-mikroba/>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Nadeak, E. M. (2019). *biokimia bakteri*. <https://www.pasundanekspress.co/opini/biokimia-bakteri/>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Rachmawaty, F. J. (2020). *Media*. <https://fk.uui.ac.id/mikrobiologi/materi/media/>
- Rahmadi. (2019). *Bakteri Asam Laktat dan Mandai Cempedak*. Mulawan University Press.
- Richard Hendarto, D., Putri Handayani, A., Esterelita, E., & Aji Handoko, Y. (2021). Mekanisme Biokimiawi dan Optimalisasi *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dalam Pengolahan Yoghurt yang Berkualitas. *Jurnal Sains Dasar*, 8(1), 13–19. <https://doi.org/10.21831/jsd.v8i1.24261>
- Rinanda, T. (2011). Analisis Sekuensing 16S Rrna Di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11(3), 172–177.
- Risnoyatningsih, S. (2008). *Yellow sweet potato starch hydrolisis into glucose enzymatically*. *J Teknik Kimia*.
- Salminen, & A Von, W. (n.d.). *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. (2nd ed.). Marcell Dekker Inc.
- Sivaramakrishnan, R., Rath, S., Kapilan, K., Kavitha, N., Kanchana, S., & Arumugam, M. (2020). In vitro anti-diabetic and anti-inflammatory activities of metabolites isolated from Marine Sponge, *Heteronema erecta* (Keller, 1889) and its in silico studies. *Research Journal of Biotechnology*, 15(12), 19–27.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., & Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1), 1–24. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Sridevi, V., Sumathi, V., Guro Prasad, M., & Murari, S. K. (2014). Fructooligosaccharides - type prebiotic: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 8(3), 321–330.
- Stapley, J., Feulner, P. G. D., Johnston, S. E., Santure, A. W., & Smadja, C. M. (2017). Recombination: The good, the bad and the variable. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1736), 1–5. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0279>

- Sumianti, D. (2008). *bakteri asam laktat*.
- Syahrurachman. (1994). *mikrobiologi kedokteran*. Binarupa Aksara.
- Yamaguchi, M., Mori, Y., Kozuka, Y., Okada, H., Uematsu, K., Tame, A., Furukawa, H., Maruyama, T., Worman, C. O. D., & Yokoyama, K. (2012). Prokaryote or eukaryote? A unique microorganism from the deep sea. *Journal of Electron Microscopy*, 61(6), 423–431. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs062>
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>

BIODATA PENULIS



Edy Fachrial, S.Si., M.Si. Lahir di Bengkulu, 21 Mei 1984 dari pasangan seorang ayah Mey Jumadi dan ibu Ely Afrida. Lulus S1 di program studi Kimia FMIPA Universitas Bengkulu pada tahun 2008. Kemudian bekerja di salah satu perusahaan bidang pembiayaan otomotif sebagai Marketing Head pada tahun 2009 hingga 2012. Pada tahun 2012 memutuskan untuk melanjutkan studi S2 di Universitas Andalas. Lulus S2 di program studi Kimia FMIPA Universitas Andalas tahun 2014. Saat ini bertugas sebagai dosen tetap pada Fakultas Kedokteran Universitas Prima Indonesia, sekaligus menjabat sebagai Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Prima Indonesia masa kerja 2017-sekarang. Pernah menjabat sebagai Koordinator Wilayah verifikator SINTA Sumatera Utara pada tahun 2018-2019. Mengampu mata kuliah Biokimia dan Metode Penelitian. Aktif menulis artikel di jurnal nasional terakreditasi dan jurnal internasional terindeks scopus. Penulis juga sering memenangkan berbagai macam hibah penelitian dari Kemdikbud Dikti sejak 2016 hingga sekarang. Saat ini penulis sedang melanjutkan pendidikan S3 ilmu Kimia di Universitas Riau.



Sari Anggraini, S.Si., M.Si., lahir di Pekanbaru, 29 Januari 1991. Lulus Strata 1 di Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, tahun 2012. Melanjutkan Strata 2 dan mendapatkan gelar Magister Science di Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas pada tahun 2014. Mulai tahun 2015, aktif mengajar mata kuliah Ekologi, Agronomi dan Perlindungan Tanaman di Program Studi Agroteknologi Fakultas Agroteknologi Universitas Prima Indonesia, Sumatera Utara. Penulis aktif melakukan penelitian mengenai cadangan karbon kelapa sawit dan mendapatkan hibah penelitian dosen pemula dari Kementerian Ristek dan Teknologi/Badan Ristek dan Inovasi Nasional tahun pelaksanaan 2019-2020 dan 2020-2021. Penulis telah memiliki karya ilmiah yang telah memiliki legalitas HAKI dalam bidang cadangan karbon kelapa sawit.



Harmileni, S.Si., M.Si. Lahir di Pesisir Selatan, 15 Juni 1985 dari Pasangan seorang ayah Darusman dan ibu Yurniati. Lulus S1 dan S2 di Program Studi Kimia FMIPA Universitas Andalas pada tahun 2008 dan 2010. Pernah bekerja menjadi guru di SMA Unggul CT Foundation tahun 2013 hingga tahun 2015 dan menjadi dosen tetap di Prodi Agroteknologi Universitas Prima Indonesia Medan hingga tahun 2017. Pada tahun 2018 mulai bergabung di Kementerian Perindustrian Republik Indonesia dengan penempatan di kampus Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan dan menjadi dosen tetap di program studi Teknik Kimia. Tahun 2020 diangkat menjadi Sekretaris Program Studi Teknik Kimia Politeknik Teknologi Kimia Industri Medan hingga sekarang. Penulis mengampu mata kuliah Oleokimia dan Kimia Organik. Aktif menulis artikel di jurnal nasional dan internasional. Penulis juga sering memenangkan berbagai macam hibah penelitian dari Kemdikbud Dikti dan Kemenperin sejak 2016 hingga sekarang.