

AKTIVITAS BIOKIMIA MIKROORGANISME

Bakteri memiliki berbagai aktivitas biokimia (pertumbuhan dan perbanyakan) dengan menggunakan *raw material* (nutrisi) yang diperoleh dari lingkungan sekitarnya. Transformasi biokimia dapat timbul didalam dan diluar dari bakteri yang diatur oleh katalis biologis yang dikenal sebagai enzim.

Setiap bakteri memiliki kemampuan dalam menggunakan enzim yang dimilikinya untuk degradasi karbohidrat, lemak, protein, dan asam amino. Metabolisme atau penggunaan dari molekul organik ini biasanya menghasilkan produk yang dapat digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi bakteri.

pengamatan aktivitas biokimia atau metabolisme mikroorganisme yang diketahui dari kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan dan menguraikan molekul yang kompleks seperti karbohidrat, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu dilakukan pula pengamatan pada molekul-molekul sederhana seperti asam amino dan monosakarida. Dan hasil dari berbagai uji ini digunakan untuk perincian dan identifikasi mikroorganisme.

Penggunaan zat hara tergantung dari aktivitas metabolisme mikroba. Metabolisme seringkali menghasilkan hasil sampingan yang dapat digunakan untuk identifikasi mikroorganisme. Pengamatan aktivitas

metabolisme diketahui dari kemampuan mikroorganisme untuk menggunakan dan menguraikan molekul yang kompleks seperti zat pati, lemak, protein dan asam nukleat. Selain itu pengamatan juga dilakukan pada molekul yang sederhana seperti amino dan monosakarida.

1. Fermentasi Karbohidrat

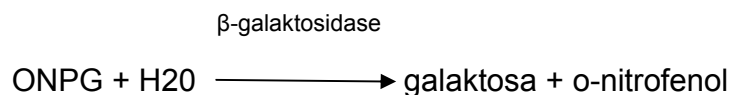
Kemampuan memfermentasikan berbagai karbohidrat dan produk fermentasi yang dihasilkan merupakan ciri yang sangat berguna dalam identifikasi mikroorganisme. Hasil akhir dari fermentasi karbohidrat ini ditentukan oleh sifat mikroba, media biakan yang digunakan, serta faktor lingkungan antara lain pH dan suhu. Media fermentasi harus mengandung senyawa yang dapat dioksidasi dan difermentasikan oleh mikroorganisme. Glukosa merupakan senyawa yang paling sering digunakan oleh mikroorganisme dalam proses fermentasi itu. Selain itu terdapat pula media sukrosa dan laktosa.

Fermentasi merupakan proses oksidasi biologi dalam keadaan anaerob dimana yang bertindak sebagai substrat adalah karbohidrat. Dimana hasil dari fermentase ini berbeda-beda bergantung pada jenis bakterinya misalnya saja asam laktat, asam cuka, CO₂ dan asam tertentu lainnya.

Pada percobaan ini digunakan tiga medium yang berbeda yaitu LB, SB, dan GB. Dan mikroorganisme yang digunakan *Bacillus subtilis* dan *S. epidermis*. Dimana pada uji fermentasi karbohidrat ini, yang akan dilihat adalah pembentukan asam yang akan terlihat dari perubahan warna medium menjadi kuning dan pembentukan gas yang terlihat dari adanya gas dalam tabung durham.

Perubahan warna medium mejadi kuning disebabkan karena terdapatnya indicator brom timol blue (BTB) dalam medium. Dimana penambahan indicator BTB ke dalam medium yang mengalami fermentasi karbohidrat jadi asam dalam keadaan aerob, maka pH akan turun dan akhirnya indikator BTB ini akan berubah warna menjadi kuning.

Beberapa mikroorganisme seperti *E. coli*, dapat menggunakan laktosa sebagai sumber karbon. Selain laktosa, substrat alamiah dari enzim, adalah bahan yang sangat penting, ONPG (o-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside), dapat digunakan pula. B-galaktosidase dapat mengkatalisis ONPG dengan reaksi sebagai berikut :



ONPG tidak berwarna tetapi setelah hidrolisis menjadi o-nitrofenol, akan timbul warna kuning pada larutan yang alkali. Tes ini dapat digunakan untuk identifikasi beberapa jenis bakteri.

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

- a) Fermentasi asam laktat : bakteri asam laktat (*Streptococcus*, *Lactobacillus*)
- b) Fermentasi alkohol : *Zygomonas*, *Saccharomycetes*
- c) Fermentasi asam propionate : bakteri asam propionate (*Propionibacterium*)
- d) Fermentasi 2,3-butanadiol : *Enterobacter*, *Serratia*, *Bacillus*.
- e) Fermentasi asam campuran : bakteri enterik (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*)
- f) Fermentasi asam butirat : *Clostridium*

2. Uji MRVP

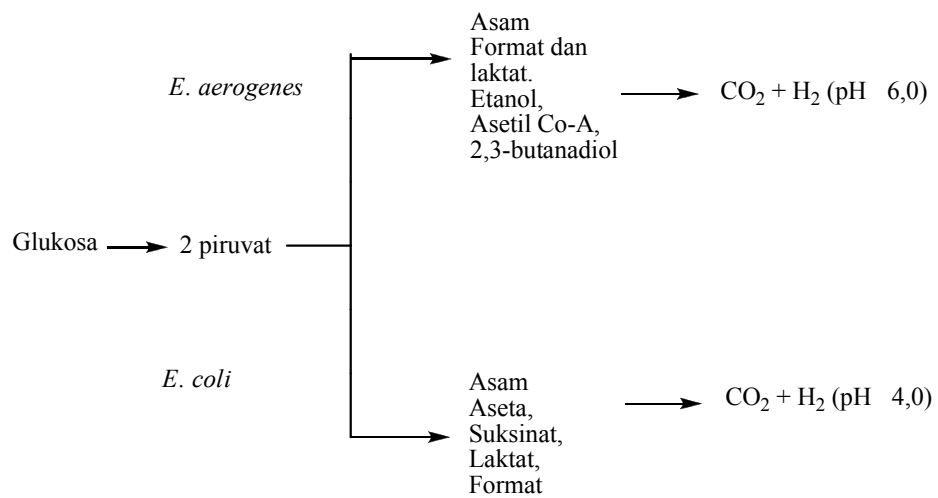
Uji metil red digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Dimana beberapa bakteri dapat memfermentasikan glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga akan menurunkan pH media pertumbuhannya menjadi 5,0 atau lebih rendah.

Uji ini dilakukan untuk menghasilkan asam melalui proses hidrolisis yang menghasilkan asam organik sederhana.

Pengujian dengan menggunakan metil merah, Voges-Proskauer, Uji Indole serta uji penggunaan sitrat sering dikenal sebagai tes IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer, dan citrate, serta "i" adalah merupakan huruf penghubung). Tes IMViC ini digunakan untuk membedakan beberapa bakteri golongan *Enterobacteriaceae*, berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi glukosa dan laktosa, penguraian triptosan yang menghasilkan indole serta adanya enzim sitrat permease yang mampu menguraikan natrium sitrat dari medium khusus yang digunakan.

Pada percobaan ini, penambahan indikator metil merah pada akhir pengamatan dapat menunjukkan perubahan pH menjadi asam. Metil merah akan menjadi merah pada suasana asam (pada lingkungan dengan pH 4,4) dan akan berwarna kuning pada suasana basa (pada suasana lebih dari atau sama dengan 6,2). Uji ini berguna dalam identifikasi kelompok bakteri yang menempati saluran pencernaan, seperti pada golongan coliform dan enterobacteriaceae.

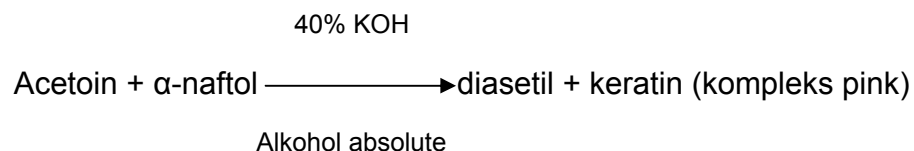
Berikut ini reaksi biokimia yang terjadi pada penguraian glukosa yang menghasilkan berbagai asam yang mampu mengubah pH sehingga mampu mengubah warna indicator pada Uji Metil merah :



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.

Mekanisme terjadinya reaksi pada Uji Voges-Proskueur dapat digambarkan sebagai berikut :



3. Uji katalase

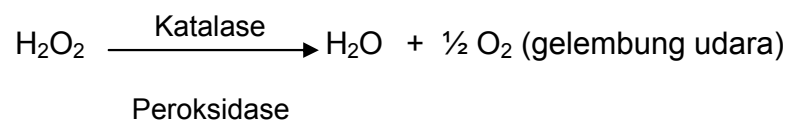
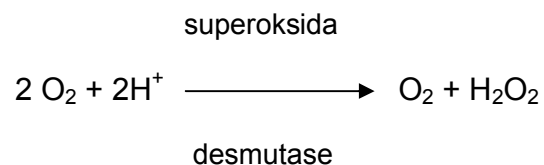
Beberapa bakteri yang memiliki flavoprotein dapat mereduksi O_2 dengan menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2) atau superoksida (O_2^-). Kedua bahan ini merupakan bahan yang toksik dan menghancurkan komponen sel dengan sangat cepat. Bakteri harus dapat mempertahankan diri seperti dengan produksi O_2 atau akan terbunuh.

Beberapa bakteri dapat memproduksi enzim yang dapat mengkatalisis superoksida yaitu peroksida dismutase, dan juga katalase atau peroksidase yang dapat mendestruksi hidrogen peroksida.

Katalase adalah enzim yang mengkatalisasikan penguraian hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2 . Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguraikan 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 :

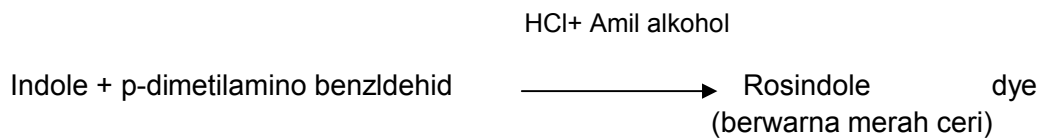
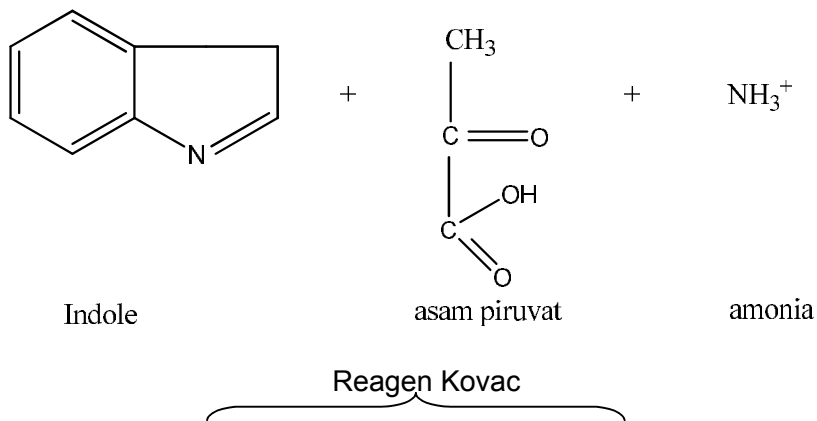
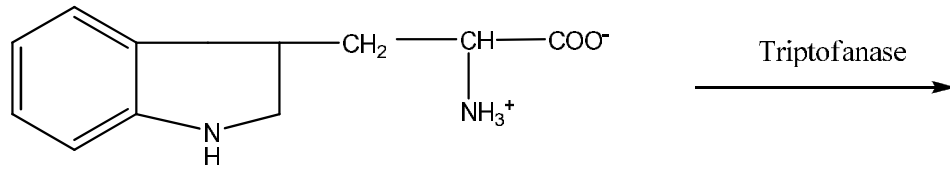


4. Uji Produksi Indol

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 mikroorganisme. Dimana asam amino triptofan apabila dihidrolisis oleh enzim triptofamase akan menghasilkan indol dan asam pemat.

Untuk uji ini, digunakan medium cair yang kaya akan triptofan yaitu dalam bentuk tripton 1% sebagai sumber karbon. Indol yang terbentuk akan berwarna merah dengan penambahan reagen Kovach atau Erlich yang mengandung p-dimetilbenzaldehyd. Dikatakan positif apabila senyawa ini menghasilkan senyawa para amino benzaldehyd yang tidak larut dalam air dan membentuk warna merah pada permukaan medium. Mekanisme terjadinya reaksi dapat digambarkan sebagai berikut :



5. Uji deaminase asam amino

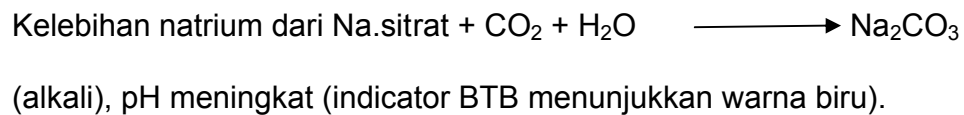
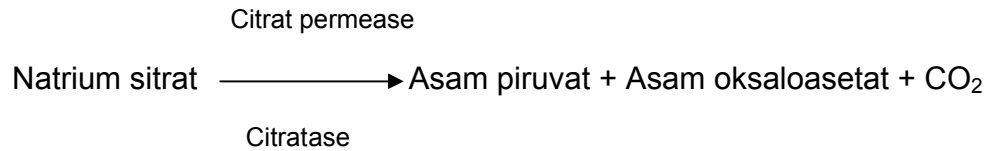
Deaminasi adalah proses mengkatalisasi pemindahan gugus amino (NH_2) dari asam amino dan molekul lainnya yang mengandung -NH . Asam organik yang dihasilkan dapat digunakan mikroorganisme untuk biosintesis. Selain itu, proses deaminasi menetralkan amin yang menghambat pertumbuhan.

Uji deaminasi asam amino dapat digunakan untuk identifikasi mikroorganisme saluran pencernaan. Untuk melakukan uji ini, mikroorganisme ditumbuhkan dalam medium biakan yang mengandung asam amino yaitu peptone cair. Dan pada pengamatan ditambahkan reagen Nessler sebanyak 1 tetes. Reagen Nessler ini merupakan pereaksi spesifik untuk identifikasi adanya ammonia (NH_3). Hasil uji positif jika pada akhir pengamatan menunjukkan perubahan warna kuning, karena warna kuning menunjukkan bahwa asam amino telah dideaminasi.

6. Penggunaan sitrat

Uji sitrat merupakan salah satu pengujian dari kelompok tes IMViC. Pengujian ini digunakan untuk melihat kemampuan mikroorganisme menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi. Untuk uji ini digunakan medium sitrat koser (SCA) yang merupakan medium sintetik dengan Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH_4^+ sebagai sumber N dan indikator BTB (Brom Timol Blue) yang merupakan indikator pH.

Bila mikroba mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium biakan, sehingga menyebabkan peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru.



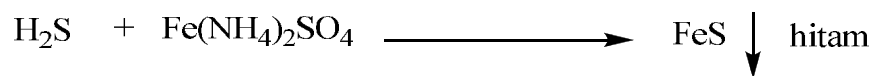
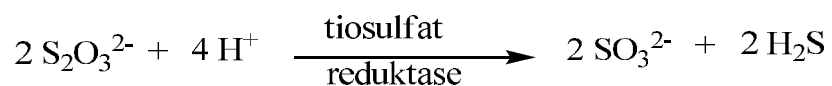
7. Uji motility

Motilitas adalah salah satu dari ciri makhluk hidup, begitu pula dengan mikroorganisme, 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.

Beberapa protein kaya akan asam amino yang mengandung gugus sulfur seperti sistein. Jika protein ini dihidrolisis oleh bakteri, asam amino akan dilepaskan. Sistein dengan adanya sistein desulfurase, akan melepaskan atom sulfur yang dengan adanya hydrogen dari air akan membentuk gas hydrogen sulfide. gas ini juga dapat diproduksi dengan reduksi senyawa anorganik yang mengandung sulfur seperti tiosulfat, sulfat atau sulfit.

Pada percobaan ini, sebagai petunjuk adanya aktivitas motilitas ini dapat diamati daerah bekas tusukan dari medium yang telah diinokulasikan oleh biakan dan diinkubasikan. Medium ini ditambahkan senyawa anorganik yang mengandung sulfur, yaitu natrium tiosulfat. Natrium tiosulfat ini akan bereaksi dengan ion hidrogen dari air, dan dengan adanya enzim tiosulfat reduktase, maka akan dihasilkan ion sulfidat dan gas H₂S. Gas ini akan bereaksi dengan feri ammonium sulfat yang ditambahkan (sebagai indikator untuk H₂S) ke dalam media sehingga terbentuk FeS yang berwarna hitam. Pembentukan FeS inilah yang diamati sebagai penunjuk adanya aktivitas motil dari bakteri uji pada tabung yang berisi medium motility setelah diinkubasikan.

Berikut ini adalah mekanisme reaksi yang terjadi pada uji motilitas :



8. Uji oksidasi fermentasi

Fermentasi dan oksidasi adalah dua proses penting dalam metabolisme mikroorganisme. Dimana tujuan akhirnya adalah akumulasi

energi, baik untuk aktivitas mikroorganisme 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 mikroorganisme untuk menggunakan karbohidrat dengan cara fermentasi atau oksidasi.

9. Uji H₂S

Pengujian ini menggunakan medium TSIA (Triple Sugar Iron Agar), uji ini digunakan untuk membedakan antara anggota kelompok Enterobacteriaceae dan membedakan kelompok Enterobacteriaceae dengan kelompok lainnya.

Pada uji ini digunakan bakteri *Bacillus subtilis* dan *S. epidermis* dengan menggunakan medium TSIA yang mengandung tiga macam gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Kemudian diinkubasi selama 7x24 jam pada suhu 37°C.

H₂S diproduksi oleh beberapa jenis mikroorganisme melalui pemecahan asam amino yang mengandung unsur belerang (S) seperti lisin dan metionin. H₂S dapat juga diproduksi melalui reduksi senyawa-senyawa belerang anorganik, misalnya : tiosulfat, sulfit atau sulfat.

Adanya H₂S dapat diamati dengan menambahkan garam-garam logam berat ke dalam medium. Dikatakan positif apabila H₂S bereaksi dengan senyawa-senyawa ini ditandai dengan terbentuknya logam sulfid yang berwarna hitam. Dan dikatakan negatif apabila tidak terbentuk logam sulfid yang berwarna hitam karena bakteri yang berada dalam medium tersebut tidak dapat menghidrolisis logam-logam berat yang terkandung dalam medium.

Pada percobaan ini, reaksi yang dapat timbul adalah :

- a) Kuning pada butt (dasar) dan merah pada slant (permukaan miring), menunjukkan adanya fermentasi glukosa.
- b) Kuning pada butt dan slant, menunjukkan adanya fermentasi laktosa dan/atau sukrosa.
- c) Pembentukan gas, yang ditandai dengan pembentukan ruang udara dibawah medium sehingga medium terangkat ke atas.
- d) Pembentukan gas (H₂S), terlihat dari pembentukan warna hitam pada medium.
- e) Merah pada butt dan slant, menunjukkan tidak adanya fermentasi gula dan pembentukan gas atau pembentukan H₂S.

LAMPIRAN

Komposisi Medium

1. Gelatin

Gelatin	150 g
Aquadest	1000 ml

2. Koser Citrat Agar (SCA)

NaCl	5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,28 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1g
Asam sitrat	2 g
Aquadest	1000 ml

3. LB

Pepton from gelatin	3 g
Meat ekstrak	3 g
Lactosa	5 g
Aqua destillata	1000 ml

4. NB

Peptone from meat	2 g
Ekstrak Beef	3 g
Aquadest	1000 ml

5. OF (Hug and Leifson)

Pepton	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	3,8 g
Brom Thymol Biru 1%	15 mL
Aquadest	1000 ml

6. MR dan VP (glukosa fosfat Broth)

D- glukosa	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Peptone	0,5 g
Aquadest	1000 mL

7. SIM (Motility)

Pepton dari kasein	20,0 g
Pepton daging	6,6 g
NH ₄ Fesitrat	0,2 g

Na ₂ S ₂ O ₃	0,2 g
Agar	3,0 g
Aquadest	1000 ml
8. Medium tripton 1 %	
Tripton	10 g
Air suling	1000 ml
9. Medium gelatin	
Gelatin	150 g
Air suling ad	1000 ml
10. Medium peptone cair 1%	
Pepton	10 g
Aquadest	1000 ml
11. Medium NA	
Pepton from meat	5 g
Ekstrat meat	3 g
Agar	12 g
12. Medium motility	
Gelatin	80 g
Peptone from meat	10 g
Ekstrak beef	3 g
Sodium chloride	3 g

Agar	30 g
Aqua destillata	1000 ml

DAFTAR PUSTAKA

1. Djide, Natsir & Sartini. 2006. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi. Universitas Hasanuddin. Makassar ; 123.
2. Dwijoesepuro. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang ; 73, 74.
3. Prescott, Harley. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. The MC-Graw Hill Companies. New York ; 126, 139.