**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Klasik Enzim**

**2.1.1 Definsi Klasik Enzim**

Enzim adalah molekul protein kompleks yang dihasilkan oleh sel hidup dan berkerja sebagai katalisator dalam berbagai proses kimia di dalam tubuh. Industri enzim berkembang sangat luas dan berperan penting dalam bidang industri. Enzim berperan penting dalam kehidupan semua mahluk hidup, terutama pada manusia. Salah satu Enzim yang berperan penting dalam kehidupan manusia adalah enzim protease. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Beberapa sumber yang dapat menghasilkan enzim protease ini, yaitu dari tumbuhan, hewan dan mikroba. Mikroba lebih sering digunakan karena kemampuannya untuk menghasilkan enzim yang bersifat termostabil (Suwarny dkk., 2022).

Enzim ditemukan pada paruh kedua abad kesembilan belas, dan pada tahun 1878, ahli fisiologi Jerman Wilhelm Kuhne adalah ilmuwan pertama yang menggunakan kata enzim saat menjelaskan proses fermentasi gula oleh ragi. Kata tersebut berasal dari kata Yunani *en* (berarti di dalam) dan *zume* (berarti ragi) Enzim, biasanya, adalah protein globular dan terdiri dari rantai asam amino linear panjang yang terlipat untuk menghasilkan struktur tiga dimensi (Kosme dkk, 2023).

Menurut Kamus Besar Bahasa Indonesia (KBBI) Klasik memiliki 5 definisi yaitu: 1. Mempunyai nilai atau mutu yang diakui dan menjadi tolok ukur kesempurnaan yang abadi; tertinggi. 2. Karya sastra yang bernilai tinggi serta langgeng dan sering dijadikan tolok ukur atau karya susastra zaman kuno yang bernilai kekal. 3. Bersifat seperti seni klasik, yaitu sederhana, serasi, dan tidak berlebihan. 4. Termasyhur karena bersejarah. 5. Tradisional dan indah (tentang potongan pakaian, kesenian, dan sebagainya



**Gambar 2.1** Minuman *Classic Enzyme*

(Sumber: gambar pribadi)

**2.1.2 Manfaat Enzim**

Enzim dapat digunakan sebagai bahan tambahan pangan dan bahan pembantu pengolahan, enzim lain, seperti lisozim dan invertase, digunakan sebagai bahan tambahan. Di antara semua kelompok enzim makanan dan minuman, amilase, pektinase, dan selulase banyak digunakan dalam industri minuman. Enzim digunakan dalam berbagai aplikasi pangan, termasuk pembuatan roti, pembuatan bir, susu, minyak/lemak, minuman, jus, dan anggur dan sebagian besar enzim komersial yang digunakan dalam makanan dan minuman diproduksi secara massal menggunakan inang jamur baik ragi (uniseluler) maupun jamur berfilamen (multiseluler).

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* telah banyak digunakan untuk makanan dan minuman beralkohol karena kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi etanol dan karbon dioksida. Jamur atau kapang berfilamen juga telah digunakan untuk produksi makanan dan minuman. Sebagai contoh, miso adalah bumbu dapur tradisional Jepang yang diolah menggunakan *Aspergillus oryzae* dan *A. sake* untuk fermentasi kedelai, barley, atau beras. Namun, jamur juga dapat menjadi komponen penting dari produk makanan akhir ( strain *Penicillium roqueforti* yang digunakan dalam keju biru). Pada tahun 1894, pembuatan kompleks enzim dari *A. oryzae* dikembangkan untuk menghasilkan berbagai produk enzim dalam fermentasi terendam (Kosme dkk, 2023).

**2.1.3 Macam-macam Enzim**

Glukoamilase yang merupakan enzim exo-acting yang mengkatalisis hidrolisis pati polisakarida dari ujung non-pereduksi, melepaskan β-glukosa. Enzim-enzim ini diproduksi oleh *Aspergillus niger* , *A. awamori* , dan *Rhizopus oryzae* dan digunakan secara luas untuk aplikasi industry. Mereka ditemukan dalam berbagai aplikasi dalam industri minuman, seperti produksi sirup manis (glukosa tinggi dan fruktosa tinggi), dan memainkan peran penting dalam produksi sake, kecap, serta bir ringan.

Protease asam dari *Aspergillus usamii* telah digunakan untuk peningkatan sifat fungsional gluten gandum, memungkinkan pelepasan peptida dan asam amino untuk fermentasi yang tepat, tidak hanya untuk pembuatan roti tetapi juga untuk pembuatan bir, karena mereka efisien bahkan pada pH rendah dengan menyeimbangkan profil asam amino bir.

Enzim lipase, yang diproduksi oleh *A. niger* atau *A. oryzae* , digunakan dalam produksi anggur untuk memodifikasi aroma anggur. Enzim pektinolitik (poligalakturonase dan pektase) diproduksi oleh *Aspergillus* spp. dan banyak digunakan untuk klarifikasi jus, meningkatkan hasil jus sebelum fermentasi anggur. Invertase diproduksi dari sel *Saccharomyces* spp. melalui penerapan enzim proteolitik (Kosme dkk, 2023).

**2.2 Bakteri Asam Laktat**

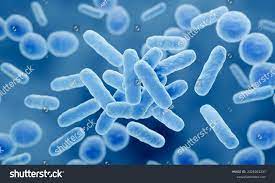
**2.2.1 Pengertian Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam Laktat merupakan bakteri gram positif, endospora-negatif, katalase-negatif, biasanya non-motil dan penghasil komponen antimikroba. Zat antimikroba BAL seperti asam laktat, hidrogen peroksida, diasetil, dan bakteriosin dapat menghambat bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Kemampuan BAL dalam menghasilkan komponen antimikroba dapat digunakan sebagai pengawet alami. Karakterisasi morfologi BAL biasanya dilakukan dengan dua cara yaitu makroskopik dan mikroskopik. Karakterisasi morfologi makroskopik BAL dilakukan dengan melihat langsung morfologi isolat bakteri yang tumbuh pada medium. Sedangkan, karakterisasi morfologi mikroskopik BAL dengan cara uji gram dan pewarnaan endospora (Nurhikmayani dkk., 2019).

Asam laktat dapat diproduksi melalui sintesis kimia maupun proses fermentasi. Proses sintesis asam laktat terjadi melalui hidrolisa laktonitril yang berasal dari asetaldehida dan hidrogen sianida. Sementara itu, pembentukan asam laktat secara biologis dapat dihasilkan satu isomer atau campuran isomer asam laktat yang berbeda tergantung oleh mikroorganisme, substrat, dan kondisi pertumbuhan yang digunakan (Maryanty dkk., 2019).

**2.2.2 Jenis Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat (BAL) terdapat dua family yaitu *Lactobacillaceae* dan *Streptococcaceae*. Terbagi atas 12 Genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* termasuk family *Lactobacillaceae* memiliki bentuk batang, sedangkan *Streptococcaceae* berbentuk bulat termasuk genus *Leuconostoc* dan *Pediococcus.* *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Aerococcus, Vagococcus, Tetragenococcus, Carnobacterium, Weissella, dan Oenococcus*. Digolongkan kedalam kelompok BAL karena memiliki kemampuan dalam memetabolisme asam laktat (Nurhikmayani dkk., 2019).

Gambar A Gambar B

**Gambar 2.2** Gambar A Bakteri *Lactobacillus* dan Gambar B Bakteri *Streptococcus*

Tabel 2. 1 Habitat Bakteri Asam Laktat

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Habitat | Kelompok Bakteri | Aktivitas atau produk |
| Produk sayuran  Produk susu  Sistem pencernaan (oral dan usus)  Vagina mamalia | *Streptococcus spp.,*  *Lactobacillus plantarum*  *Sreptococcus lactis,*  *Lactobacillus casei,*  *L. acidophilus,*  *L. delbrueckii,*  *Leuconostoc mesentroides,*  *L. lactis*  *Sreptococcus salivarus*  *S. mutans,*  *Lactobacillus salivarus*  *Sreptococcus faecalis*  *Sreptococcus* spp.,  *Lactobacillus spp.* | Pikel, sauerkraut  Keju. Susu, yoghurt  Flora normal  *dental caries*  Patogen dan saluran urin  Flora normal |

**2.2.3 Fermentasi Bakteri Asam Laktat**

Bakteri asam laktat mempunyai kemampuan menfermentasikan gula menjadi asam laktat, karena produksi asam laktat oleh BAL berjalan dengan cepat, maka pertumbuhan mikroba lain yang tidak diinginkan dapat terhambat. Bakteri asam laktat merupakan kelompok mikroba yang berperan dalam proses fermentasi pangan. Beberapa metabolit aktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu asam laktat, etanol, hidroperoksida dan bakteriosin. Metabolit yang dihasilkan oleh bakteri tersebut merupakan agen yang dapat digunakan dalam membunuh bakteri. Salah satu yang digunakan sebagai antimikroba yaitu bakteriosin yang merupakan suatu senyawa peptida. Selain itu asam laktat yang di produksi oleh BAL dapat menurunkan pH lingkungan. pH yang rendah dapat menghambat kontaminasi mikroba pembusuk dan juga membunuh mikroba patogen (Sasmita dkk., 2018).

Ada beberapa syarat yang harus diperhatikan apakah suatu BAL memiliki sifat probiotik, antara lain: ketahanan terhadap asam dan garam empedu, dan aktivitas antagonistik terhadap bakteri pathogen. Ciri- ciri bakteri asam laktat sebagai berikut BAL termasuk Gram positif, termasuk organisme anaerob fakultatif, non-spora, katalase negatif, toleran asam kecuali beberapa spesies tertentu, termasuk organisme yang aman. BAL memiliki kelebihan yaitu tidak membentuk spora, tidak motil, tahan terhadap pH asam, aerotoleran (tidak membutuhkan oksigen), katalase-negatif, produksi asam laktat (LA) yang dihasilkan dijadikan untuk produk metabolisme akhir dari fermentasi karbohidrat (Manik dkk., 2021).

Bakteri asam laktat yang terdapat pada makanan fermentasi akan memberikan kelebihan atau peranan penting dalam makanan tersebut untuk menghasilkan aroma, rasa, tekstur yang lebih baik, meningkatkan nilai gizi, keamanan dan beberapa senyawa fungsional.

Potensi bakteri asam laktat (BAL) sebagai hasil substansi antimikroba dari bahan makanan hasil fermentasi dan salah satunya adalah tape atau tapai singkong. Pemenfaatan bakteri asam laktat selain dalam industri makanan sebagai agen sintesa bekterosin dalam biopereservatif juga memberikan kontribusi yang besar di bidang kesehatan seperti pengobatan mikroorganisme yang membentuk biofilm penyebab utama penyakit kronis dengan berperan sebagai agen antibiotik alami dan pangan probiotik (Hamidah dkk., 2019).

Bakteri Indigenous buah merupakan bakteri asli yang berada dalam buah. Bakteri ini masuk ke dalam buah diduga berasal pada saat penyerbukan tanaman. Bakteri berperan dan aktif disaat proses pematangan buah. Pada durian juga didapatkan bakteri indigenous pemfermentasi. Keberadaan bakteri ini dapat diketahui dengan terbentuknya *halozone* pada medium Glukosa Tripton Agar modifikasi. Bakteri indigenous dapat diperoleh dari mengisolasi bakteri tertentu pada suatu bahan contohnya di dalam buah-buahan tropis yang matang. Keberadaan mikroflora ini dapat dilacak secara in vitro melalui media-media spesifik. (Nurmalinda dkk., 2013).

Berikut ini adalah skema proses pembentukan laktosa menjadi asam laktat melalui jalur EMP:



**Gambar 2.3** Proses pembentukan laktosa menjadi asam laktat melalui jalur EMP

Proses mekanisme pembentukan laktosa menjadi asam laktat dapat diuraikan sebagai berikut: pada awal proses, laktosa yang berasal dari susu dihidrolisis dalam sel bakteri *β-D-galaktosidase* menjadi glukosa dan galaktosa serta oleh enzim *β-* *D-fosfogalaktosidase* menjadi glukosa dan *galaktosa-6-*fosfat*.* Kemudian, glukosa yang dihasilkan melalui jalur EMP berubah menjadi asam piruvat dan akhirnya enzim *laktatdehidrogenase* mengubah asam piruvat menjadi asam laktat.

Asam laktat (Nama *IUPAC* : asam 2-hidroksipropanoat (CH3 -CHOH-COOH), dikenal juga sebagai asam susu) adalah senyawa kimia penting dalam beberapa proses biokimia. Reaksi glikolisis pada lintasan EMP: C6H12O6 + 2ATP + 2 NAD+ –> 2 Piruvat + 4 ATP + 2 NADH Kemudian piruvat akan diubah menjadi laktat (atau asam laktat) dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi NAD + . *L. casei* Shirota strain memiliki enzim aldolase sehingga dapat memproduksi dua laktat dari glukosa yaitu 2-Gliseraldehid-3-fosfat dan Dihidroksiaseton fosfat (Hendarto dkk., 2019).

Dalam penelitian Azhara dkk (2022), Urnemi dkk menyatakan bahwa koloni bakteri asam laktat yang tumbuh pada media MRSA terdiri dari 2 fase pertumbuhan yaitu fase lag (adaptasi) dan fase eksponensial. Fase lag terjadi pada 0 jam hingga 3 jam, dengan jumlah koloni berada pada kisaran 6.8-6.9 Log CFU/g. Fase adaptasi adalah fase pertumbuhan koloni berlangsung secara lambat, karena sedang dalam proses beradaptasi dengan kondisi lingkungan (pH, suhu dan nutrisi). Fase pertumbuhan BAL terdiri dari 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase lag peningkatan jumlah bakteri berlangsung lambat hal ini disebabkan bakteri sedang melakukan proses aklimatisasi terhadap kondisi lingkungan (pH, suhu, dan nutrisi).

Setelah melewati fase adaptasi, fase selanjutnya adalah fase eksponensial yang dilihat dengan bertambahnya jumlah koloni secara signifikan. Fase eksponensial koloni dimulai pada waktu fermentasi jam ke-3 sampai waktu fermentasi jam ke-72. Pertumbuhan eksponensial koloni bakteri asam laktat dikarenakan bakteri telah mengalami fase adaptasi dan telah mendapatkan lingkungan (pH, nutrisi, dan suhu) yang sesuai dengan pertumbuhannya. Fase logaritmik atau fase eksponensial merupakan fase dimana pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat karena nutrient dalam media sangat cukup.

**2.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat**

**2.3.1 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk identifikasi mikroskopis. Berdasarkan pewarnaan Gram, bakteri dibagi menjadi dua yaitu Gram positif dan Gram negatif (Wulandari dan Desi., 2019). Hasil pewarnaan gram menunjukkan adanya perbedaan warna gram yang dihasilkan dari beberapa isolat bakteri. Bakteri gram positif akan menghasilkan warna keunguan sedangkan bakteri gram negatif menghasilkan warna merah. Meskipun telah diberi larutan alkohol, bakteri Gram positif akan tetap mempertahakan zat warna ungunya. Hal ini terjadi karena kandungan peptidoglikan pada Gram positif cukup banyak sehingga mampu mempertahankan warna ungu (Rimadhini dkk., 2020).



Gambar A Gambar B

**Gambar 2.5** Gambar A Uji Katalase dan Gambar B

Pewarnaan Bakteri Gram Positif

**2.3.2 Pewarnaan Endospora**

Endospora merupakan struktur tambahan dan bentuk kondisi inaktif (dormant) dari bakteri yang terbentuk di dalam sel dan memberikan perlindungan terhadap bakteri dari lingkungan yang tidak menguntungkan. Pengujian pewarnaan spora bertujuan untuk membedakan endospora dengan sel vegetatif, sehingga tampak jelas perbedaannya (Ramadhanti dkk., 2021).

Spora yang dihasilkan oleh bakteri pada pewarnaan akan menyerap pewarna malachit green, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah dikarenakan menyerap perwana safranin. Non endospora merupakan salah satu karakteristik umum yang lain dari bakteri asam laktat (Arsy dkk., 2022).

**2.3.3 Uji Katalase**

Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif dan bersifat anaerob, sehingga tidak menghasilkan enzim katalase. Uji katalase dilakukan dengan metode slide menggunakan larutan H2O2 3%. Terbentuknya gelembung gas oksigen menunjukkan hasil positif karena adanya degradasi H2O2 oleh enzim katalase (Dwijastuti dkk., 2021).

Bakteri asam laktat tidak memproduksi enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Beberapa bakteri membutuhkan oksigen untuk membentuk hidrogen peroksida, yaitu hasil samping dari metabolisme aerobic yang toksik. Reaksi kimia yang dihasilkan oleh katalisasi enzim katalase terhadap H2O2 adalah 2 H2O2  katalase 2 H2O + O2 (Arsy dkk., 2022).

**2.3.4 Uji Homofermentatif dan Heterofermentatif**

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan ke dalam dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentasi (sebagian besar hasil akhir merupakan asam laktat) dan heterofermentatif (hasil akhir berupa asam laktat, asam asetat, etanol dan CO2), secara garis besar, keduanya memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan diubah menjadi laktat (atau asam laktat) dan diikuti proses transfer elektron dai NADH menjadi NAD+. Pola fermentasi ini dapat dibedakan dengan mengetahui keberadaan enzim – enzim yang berperan di dalam jalur metabolisme glikolisis (Arsy dkk., 2022).

Heterofermentatif pada BAL tidak menggunakan aldolase dan heksosa isomerase tetapi menggunakan enzim fotoketolase dan mengahsilkan CO2. Metabolisme heterofermentative dengan menggunkan heksosa atau golongan karbohidrat terdiri dari 6 atom karbon akan melalui jalur heksosa monofosfat atau pntosa fosfat. Sedangkan homofermentatif melibatkan ladolase dan heksosa aldolase namun tidak memiliki fosfoketolase serta sedikit atau sama sekali tidak menghasilkan CO2. Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan elektron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus Lactobacillus terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub grup, kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentative. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam disbanding genus bakteri asam laktat lain (Aloysius dkk., 2019).

**2.4 Manfaat Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam Laktat atau BAL juga diketahui dapat menghasilkan senyawa antioksidan (Berliyanti dkk., 2020). Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai agensia probiotik juga dapat dimanfaatkan sebagai kultur starter proses fermentasi sehingga produk fermentasi yang dihasilkan dapat berfungsi sebagai pembawa agensia probiotik. Probiotik adalah mikroorganisme yang dapat memberikan efek menguntungkan pada kesehatan manusia. Beberapa studi melaporkan efek probiotik untuk mencegah dan mengurangi penyakit akut diare, peradangan, hipertensi, dan diabetes. Selain itu, probiotik bermanfaat dalam mengatur keseimbangan mikroba pada saluran pencernaan dan menghambat perkembangan mikroba patogen pada saluran pencernaan (Manik dkk*.,* 2021).

Proses (fermentasi pangan melibatkan berbagai jenis mikroorganisme, seperti bakteri, kapang, dan ragi yang tumbuh dan melakukan aktivitas bersama dalam bahan pakan. Sebagian besar menggunakan asam laktat BAL). Menggunakan BAL sebagai kultur starter menunjukkan beberapa manfaat seperti mempercepat proses dan memastikan kualitas dan keamanan produk. Selama fermentasi, BAL menghasilkan asam laktat yang menurunkan pH dan membatasi pertumbuhan mikroorganisme patogen, melepaskan enzim hidrolitik (lipase dan protease), serta mampu memecah makromolekul, seperti lipid dan protein, sehingga menghasilkan prekursor. dari aroma tertentu. Hal ini membuktikan bahwa BAL memiliki potens i untuk dijadikan starter kultur dan juga beberapa manfaat lain untuk kesehatan (Antara dkk., 2019).

**2.5 Antimikroba**

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk dinegara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, tetapi hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Antibiotik atau antibakteri merupakan obat yang paling banyak digunakan pada penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu syarat suatu produk dikategorikan sebagai probiotik adalah produk tersebut memiliki aktivitas antimikroba (Rizal dkk., 2020).

Antibiotik merupakan zat yang dihasilkan oleh *mikroorganisme* (jamur dan bakteri tertentu) yang efektif dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain Secara terapeutik, antibiotik menyerang organisme infeksius dan membunuh bakteri lain yang tidak menyebabkan penyakit. Antibiotik dibagi menjadi dua golongan, yaitu bakteriostatik dan bakterisidal (Kurnia dkk., 2020).

Adapun bakteri lain yang menghasilkan antibakteri yaitu *Actinomyecetes* yang berasosiasi dengan koral memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa antibakteri. Isolat *Actinomycetes* yang diisolasi dari koral memiliki genus Streptomyces sp. BD2. Ekstrak *Streptomyces sp.* BD2 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococus aureus, Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, dan Vibrio cholerae* (kurnia dkk., 2020).

**2.6 Bakteri Uji *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* termasuk bakteri Gram positif, berbentuk bulat, berdiameter 0,1 - 0.5 μm, satu-satu atau berpasangan, tidak bergerak, dinding sel mengandung dua komponen utama, peptidoglikan dan asam-asam teikoat. Metabolisme aerob dan anaerob biasanya peka terhadap panas terutama di permukaan kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir. *Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada berbagai pembenihan atau metabolisme yang aktif, meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas dan meragikan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua. *Staphylococcus* patogen sering menghemolisis darah dan mengkoagulasi plasma, beberapa diantaranya tergolong flora normal kulit dan selaput lendir manusia (Widianingsih dan Setyorini, 2019).

Klasifikasi bakteri *S. aureus menurut* Cabi (2019) sebagai berikut :

*Domain* : *Bacteria*

*Phylu* : *Firmicutes*

*Class* : *Bacilli*

*Order* : *Lactobacillales*

*Family* : *Staphylococcaceae*

*Genus* : *Staphylococcus*

*Species* : *Staphylococcus aureus*

****

**Gambar 2.6** *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* hidup sebagai saprofit didalam membran mukosa dari tubuh manusia dan hewan seperti hidung, mulut dan tenggorokan dan dapat mengelurkan batuk dan bersin. Bakteri ini juga sering terdapat pada pori-pori permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Selain dapat menyebabkan intoksikasi, *S*. *aureus* juga dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi seperti seperti jerawat, bisul, meningitis, osteomielitis, pneumonia dan mastitis pada manusia.

*Staphylococcus* tumbuh cepat dalam beberapa tipe media dan dengan aktif melakukan metabolisme. Melakukan fermentasi karbohidrat dan hampir setiap orang pernah mengalami berbagai infeksi *S.aureus* selama hidupnya dari keracunan makanan yang berat hingga infeksi kulit yang kecil sampai infeksi yang tidak bisa disembuhkan. *Staphylococcus* tumbuh dengan baik pada berbagai media bakteriologi di bawah suasana aerobik atau mikroaerofilik. Tumbuh dengan cepat pada temperatur 37º C namun pembentukan pigmen yang terbaik adalah pada temperatur kamar (20-35º C). Koloni pada media yang padat berbentuk bulat, lembut dan mengkilat. *S.aureus* biasanya membentuk koloni abu-abu hingga kuning emas. Tidak ada pigmen yang dihasilkan secara anaerobik atau media cair. Berbagai macam tingkat hemolisis dihasilkan *S.aureus* dan menghasilkan katalase. Tahan terhadap panas 50º C selama 30 menit dan natrium klorida 9% tetapi dihambat bahan kimia oleh bahan-bahan kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% *staphylococcus* menyebabkan penyakit berkat kemampuannnya melakukan pembelahan dan menyebar luas ke dalam jaringan dan melalui produksi bahan ekstraseluler. Beberapa dari bahan tersebut adalah enzim yang lain dapat berupa toksin meskipun fungsinya adalah sebagai enzim.

1. Katalase *staphylococcus* yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Tes katalase untuk membedakan *staphylococcus* positif dari *streptococcus* negatif.
2. Koagulase, *S.aureus* menghasilkan koagulase protein menyerupai enzim yang mampu mengumpulkan plasma yang ditambah dengan oksalat atau sitrat dengan adanya suatu factor dalam serum. Produksi koagulase sinonim dengan invasi potensial patogenik.
3. Enzim lain yang dihasilkan *staphylococcus* antara lain *hyaluronidase*, atau faktor penyebaran stafilokinase bekerja sebagai fibrinolisis, yang lain proteinase; lipase dan beta-lactamase.
4. Eksotoksin meliputi beberapa toksin yang bersifat letal , menyebabkan nekrosis pada kulit. Alfatoksin (hemolisin) mempunyai aksi yang sangat kuat terhadap otot polos vascular.
5. Lekosidin Toksin *S.aureus* ini dapat membunuh sel darah putih pada berbagai Binatang.
6. Toksin eksfoliatif
7. Toksin Sindroma Syok Toksik*, s.aureus* diisolasi dari pasien sindroma syok toksik yang menghasilkan racun (TSST-1).
8. Enterotoksin dihasilkan Ketika *S.aureus* tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Ingesti 25 mg enterotoksin B pada manusia atau kera menyebabkan muntah dan diare*. S.aureus* yang menetap di folikel rambut menyebakan nekrosis jaringan. Pada osteomielitis pertumbuhan *S.aureus* adalah di pembuluh darah tepi dari metafisis tulang panjang. *S.aureus* dapat menyebabkan *pneumonia, meningitis,empiema, endocarditis* atau *sepsis* dengan supurasi di tiap organ. Keracunan makanan menyebabkan enterotoksin, sindroma syok toksik ditemukan di vagina, pada tampon, pada luka atau infeksi yang terlokalisir atau pada tenggorokan tapi untuknya tidak pernah di aliran darah (Brooks, 2005).

**2.7 Media Selektif MRSA dan MRSB**

Media merupakan substrat yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mengembang biakkan mikroorganisme. Sebelum dipakai dalam percobaan, media ini perlu disterilkan terlebih dahulu, supaya tidak ditumbuhi oleh mikroorganisme yang tidak dikehendaki atau kontaminasi. Faktor-faktor yang memperngaruhi pertumbuhan bakteri dalam media biakan antara lain yaitu unsur nutrisi, oksigen, pH, suhu yang sesuai dan harus dijaga agar tidak terkontaminasi. Agar mikroba yang kita kultur dapat tumbuh dengan baik maka persyaratan yang harus dipenuhi oleh suatu media adalah:

1. Didalamnya harus terkandung bahan-bahan yang diperlukan oleh mikroba yang akan ditumbuhkan. Bahan-bahan ini meliputi unsur-unsur makro dan unsur mikro dan trace elemen serta zat pengatur tumbuhan.
2. Media tersebut harus mempunyai tekanan osmosis, tegangan permukaan, dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang akan dikultur.
3. Media harus dalam keadaan steril sebelum dipakai untuk menumbuhkan mikroba yang diperlukan ( Sujaya, 2017).

Kriteria yang sesuai untuk klasifikasi bakteri adalah pertumbuhan pada jenis medium bakteriologi yang berbeda. Pembiakan umum sebagian besar bakteri membutuhkan medium yang kaya akan zat gizi metabolik. Medium ini umumnya terdiri atas agar, sumber karbon, dan asam hidrolisat atau sumber materi biologis yang terurai dengan enzim (misalnya kasein). karena komposisi medium terakhir tidak menetap maka jenis medium ini disebut medium kompleks (Jawetz, 2014).

Menurut sifatnya media/medium dapat digolongkan menjadi:

1. Medium Non-selektif: agar darah dan agar coklat adalah contoh medium non-selektif kompleks, yang mendukung pertumbuhan banyak bakteri yang berbeda. Medium ini berfungsi untuk mengembangkan sebanyak-banyaknya spesiae yang mungkin dikembangkan sehingga menghasilkan banyaknya jenis koloni.
2. Medium selektif: karena keberagaman mikroorganisme yang terletak khususnya di beberapa tempat pengambilan sampel (misalnya kulit, saluran pernapasan, usus, vagina), medium selektif digunakan untuk mengeleminasi atau mengurangi sejumlah besar bakteri yang tidak relevan dan spesimen ini. Dasar medium selektif adalah pengumpulan bahan-bahan penghambat yang secra spesifik memilih pertumbuhan bakteri yang tidak relevan. Contoh bahan-bahannya adalah Natrium azida ( memilih bakteri gram positif daripada bakteri gram negatif. Garam empedu ( misalnya natrium deoksilat memilih bakteri usus gram negatif dan menghambat bakteri mukosa gram negatif serta sebagian besar bakteri gram positif. Kolistin dan asam nalidiksat ( menghambat pertumbuhan banyak bakteri gram negatif. Contoh medium selektif adalah agar MacConkey (mengandung empedu) yang mendukung *Enterobactericeae* dan agar darah CNA (mengandung kolistin dan asam nalidiksat) yang mendukung stapilokokus dan steptokokus.
3. Medium diferensial: Pada kultur beberapa bakteri menghasilkan pigmen khusus dan bakteri lainnya dapat dibedakan berdasarkan komplemen enzim ekstraselulernya. Aktivitas enzim ini sering dapat dideteksi sebagai daerah jernih di sekeliling koloni yang tumbuh dengan adanya substrat yang tidak larut contohnya daerah hemolisis di dalam medium agar yang mengandung sel darah merah. Jumlah medium diferensial yang digunakan pada laboratorium klinis saat inisangat banyak (Jawetz, 2014).

Menurut bahan yang dipakai dalam pembuatannya media dapat digolongkan menjadi:

1. Media alami: Media yang komponen pembentuknya terdiri dari bahan-bahan alam seperti tauge, daging, nasi dan lain sebagainya.
2. Media semi sintetik: Media yang bahan pembentuknya terdiri dari campuran bahan-bahan alami dan bahan sintetik. Contoh agar tauge, agar kentang, dekstrosa dan lain-lain.
3. Media intetik: Media yang bahan pembentuknya secara keseluruhan terbuat dari bahan-bahan sintetik contoh agar sabouraud, endo agar, agar Czapek dox dan lain-lain ( Sujaya, 2017).

Menurut bentuknya media dapat digolongkan menjadi:

1. Media cair: Media yang tidak ditambahkan zat pemadat( agar), sehingga media ini dalam keadaan encer ( cair). Contoh *lactose broth* (LB), *nutrient broth* (NB)
2. Media semi padat: Media yang mengandung bahan yang sama dengan media cair tetapi ditambah sedikit agar ( setengah konsentrasi agar) sehingga menjadi agak padat. Media ini dipakai untuk menumbuhkan
3. mikroba yang banyak memerlukan air dan hidup dalam lingkungan yang anaerob atau anaerob fakultatif. Media ini juga dipakai untuk motilitas suatu bakteri.
4. Media padat : Media cair yang ditambahkan dengan agar-agar sehingga menjadi padat. Contohnya *nutrient agar* (NA), *potato dextrose agar* (Sujaya, 2017).

Menurut kegunaannya media digolongkan menjadi:

1. Media umum : Media yang digunakan untuk menumbuhkan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum contoh *nutrient agar*( media untuk menumbuhkan kelompok bakteri), *potato dextrose agar*( media yang dipakai untuk menumbuhkan kelompok jamur) dan lain-lain.
2. Media pengaya: Media yang dipakai untuk menyuburkan mikroba tertentu sebelum ditumbuhkan pada media yang dipakai dalam penelitian contohnya selenit broth.
3. Media selektif: Media yang dipakai untuk menumbuhkan spesies tertentu dari mikroba, dengan menghambat pertumbuhan spesies lain yang tidak dikehendaki. Contoh: MRSB dan MRSA untuk bakteri Asam Laktat*.*
4. Media penghitungan: Media yang dipakai untuk menghitung jumlah mikroba suatu bahan. media ini dapat berupa media umum dan media selektif ( Sujaya, 2017).

Bakteri asam laktat biasanya ditumbuhkan pada media *de Mann Rogose and* *Sharpe* (MRS). Media MRS merupakan media spesifik untuk pertumbuhan bakteri asam laktat. Media MRSA dan media MRSB merupakan media selektif yang hanya dapat menumbuhkan bakteri asam laktat (BAL) tetapi kedua media ini digunakan pada tujuan yang berbeda. Media MRSA digunakan untuk menumbuhkan dan mengisolasi isolat bakteri asam laktat yang tumbuh berkoloni sedangkan media MRSB merupakan media berbentuk cair yang digunakan untuk memproduksi dan memudahkan BAL untuk melepaskan bakteriosin pada media cair tersebut (Aloysius dkk., 2019).

MRSA didesain untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat termasuk genus *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus*, dan *Leuconostoc.* Ini dikarenakan media MRSA mengandung beberapa komponen yang dapat menunjang pertumbuhan bakteri tersebut. Media MRSA mengandung dekstrosa, ekstrak daging, ekstrak ragi, ammonium sitrat, magnesium sulfat, pepton, natrium asetat, dikalium fosfat, tween 80 dan mangan sulfat. Kandungan ammonium sitrat pada pH rendah menunjang pertumbuhan bakteri asam laktat. Dikalium fosfat dan natrium asetat merupakan dapar untuk menjaga pH tetap rendah, sementara tween 80 adalah pelarut zat- zat lain. Mangan dan magnesium sulfat merupakan sumber dari ion dan sulfat (Suwarny dan Nur Ismah, 2022).

Pada media MRS digunakan glukosa sebagai sumber karbon dengan konsentrasi 20 g/L. Karbohidrat merupakan sumber energy utama pertumbuhan bakteri asam laktat. Sehingga pertumbuhan dan aktivitas metabolismenya dipengaruhi oleh sumber tersebut. Untuk setiap MRS broth (*de Mann Rogosa* *Sharp*) yang digunakan setiap 1 liter medianya mengandung: pepton protease No. 3 sebanyak 1%; beef extract 1%; ekstrak yeast 0,5%; polisorbat 80 0,1%; ammonium sitrat 0,2%; Na asetat 0,5%; magnesium sulfat 0,01%; mangan sulfat 0,005%; dan dikalium fosfat 0,2% (Arsy dkk., 2022).

Tabel 2.2 Medium MRSA

|  |  |
| --- | --- |
| *Ingredients* | *Gms / Litre* |
| Proteose peptone | 10.000 |
| HM Peptone B # | 10.000 |
| Yeast extract | 5.000 |
| Dextrose (Glucose) | 20.000 |
| Tween 80 (Polysorbate 80) | 1.000 |
| Ammonium citrate | 2.000 |
| Sodium acetate | 5.000 |
| Magnesium sulphate | 0.100 |
| Manganese sulphate | 0.050 |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 2.000 |
| Agar | 12.000 |
| Final pH ( at 25°C) | 6.5±0.2 |

**2.8 Isolasi Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam Laktat (BAL) dapat diisolasi dari produk fermentasi hewan dan tanaman, seperti pada produk hewani yaitu susu dan olahannya, dan pada saluran pencernaan. Pada buah-buahan dan sayuran, BAL dapat diisolasi dari buah sirsak, nanas, acar, kopi dan kakao fermentasi. Pada biji kopi dan kakao, BAL berguna untuk meningkatkan kualitas baik segi rasa, warna dan aroma (Sumual dan Tallei, 2019).

Prinsip dari isolasi BAL adalah memisahkan suatu mikroba dari mikroba lainnya sehingga diperoleh kultur murni. Isolasi Bakteri Asam Laktat diawali dengan melakukan inokulasi sampel pada medium pengaya (enrichment) *de Mann, Rogosa, Sharpe Broth* (MRSB) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 370ºC dalam desikator. Pengayaan dalam MRSB dapat meningkatkan jumlah koloni BAL secara cepat sehingga jumlahnya lebih banyak. Hal ini terjadi karena MRSB secara umum diaplikasikan sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat dan mempunyai nilai pH optimum untuk pertumbuhan BAL yaitu 5,7 yang dapat menekan pertumbuhan sebagian besarmikroorganisme lain (Rasyid dkk., 2021).