

KARAKTERISASI BERDASARKAN UJI ASPEK MORFOLOGI DAN BIOKIMIA SERTA PENGARUH AERASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Zymomonas mobilis* GALUR LIAR (ZM JPG)

Teta Mumtaz Kurniasari.¹⁾, Surya Rosa Putra¹⁾

¹⁾Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

ABSTRAK

Zymomonas mobilis merupakan bakteri anaerob fakultatif yang memiliki karakteristik gram negatif berbentuk batang, uji oksidase negatif, uji katalase positif, tidak membentuk indol dan tidak menghidrolisis gelatin. Beberapa karakteristik lain diantaranya seperti motilitas, pembentukan H₂S, serta kadar toleransi terhadap oksigen bervariasi hasilnya antar galur *Z. mobilis*. *Z. mobilis* ZM JPG koleksi laboratorium kimia ITS diuji aspek morfologi serta aspek biokimianya. Hasil uji menyatakan bahwa ZM JPG memiliki karakteristik gram negatif berbentuk batang, bersifat anaerob fakultatif, bentuk koloni bundar, tepi koloni utuh, konvek dan berwarna putih. ZM JPG bersifat motil, tidak dapat tumbuh pada laktosa dan mannitol, dapat menfermentasi glukosa dan sukrosa, uji oksidase negatif, uji katalase positif, tidak membentuk H₂S dan tidak membentuk indol. ZM JPG mampu tumbuh pada media dengan konsentrasi glukosa sebesar 100 g/l. Fase lag berlangsung selama 5 jam baik pada media yang diaerasi maupun yang tidak diaerasi. Fase pertumbuhan diperlambat pada media yang diaerasi lebih singkat yakni 3 jam sedangkan pada media yang tidak diaerasi berlangsung selama 8 jam. Pertumbuhan optimum dicapai pada inkubasi selama 34 jam baik pada media yang diaerasi maupun yang tidak diaerasi.

Kata kunci: *Zymomonas mobilis*, ZM JPG, uji morfologi, uji biokimia, efek aerasi

PENDAHULUAN

Zymomonas mobilis merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dan bersifat anaerob fakultatif. *Z. mobilis* menempuh jalur Etner-Doudoroff dan menfermentasi glukosa, fruktosa, dan sukrosa menjadi etanol sebagai produk utamanya. *Z. mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* antara lain lebih tahan terhadap konsentrasi etanol kadar tinggi juga dapat tumbuh pada konsentrasi gula kadar tinggi.

Z. mobilis yang telah diteliti ada sebanyak 74 galur yang diisolasi dari berbagai sumber. *Z. mobilis* dikarakterisasi sebagai bakteri gram negatif berbentuk batang dengan panjang 2-6 µm dan lebar 1-1,4 µm. Jika *Z. mobilis* bersifat motil, maka mereka akan memiliki 1-4 flagela polar. Koloni dalam medium standard akan mengkilat, berwarna putih atau krem dan berdiameter 1-2 mm setelah 2 hari pada suhu 30°C. Seluruh galur yang diteliti memiliki hasil uji oksidase negatif, uji katalase positif, tidak menghasilkan indol, tidak menghidrolisis gelatin serta tidak mereduksi nitrat. Sedangkan terdapat beberapa karakteristik yang hasilnya bervariasi antar galur *Z. mobilis* beberapa diantaranya yakni motilitas, pembentukan H₂S, morfologi koloni yang dapat berbentuk *konvek* atau *umbonate*, dan kadar toleransi terhadap oksigen (Swings dan De Ley, 1977).

Beberapa galur *Z. mobilis* yang telah diteliti menghasilkan etanol dengan kadar yang berbeda meskipun kondisi fermentasinya sama (Gunasekaran, dkk., 1986). Hal ini disebabkan oleh karakteristik dari tiap *Z. mobilis* yang bersifat anaerob fakultatif akan tetapi kadar

toleransinya terhadap oksigen berbeda satu dengan yang lain. Bahkan galur *Z. mobilis anaerobia* justru pertumbuhannya terhambat apabila diaerasi (Swings dan De Ley, 1977).

Laboratorium biokimia ITS memiliki beberapa koleksi galur *Z. mobilis*, salah satu diantaranya adalah *Z. mobilis* galur liar ZM JPG yang belum diteliti aspek morfologi dan biokimianya serta kadar toleransinya terhadap oksigen. Penelitian ini dapat melengkapi profil ZM JPG secara detil dan nantinya dapat digunakan untuk eksplorasi lebih lanjut akan potensinya bukan hanya sebagai produsen etanol tetapi juga potensinya sebagai produsen sorbitol.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni bakteri *Zymomonas mobilis* jpg yang diperoleh dari laboratorium Biokimia FMIPA ITS, Surabaya, Media nutrient agar (NA), glukosa, sukrosa, yeast ekstrak, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, larutan NaOH, larutan H_2SO_4 , aquabides, aquademineralisasi, reagen DNS, *methylen blue*, minyak imersi, kristal violet, larutan iodin, etil alkohol, safranin, *thioglycollate*, agar dan media semi padat *Sulfide Indol Motility* (SIM), glukosa, laktosa, sukrosa, manitol, *pepton water*, *bromtimol blue*, *MRVP broth* dan malakit hijau.

Identifikasi Morfologi *Zymomonas mobilis* secara Makroskopik

Pengamatan makroskopik dan mikroskopik merupakan salah satu langkah karakterisasi isolat bakteri, selain dengan uji biokimia. Pengamatan mikroskopik adalah untuk mengetahui bentuk sel isolat bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan sederhana menggunakan metilen blue. Sedang pengamatan makroskopik adalah pengamatan bentuk pertumbuhan koloni yang bakteri yang tumbuh di permukaan media padat NA-HgCl₂ 10 ppm. Paramater karakter koloni meliputi :

- Bentuk koloni (dilihat dari atas): berupa titik-titik, bulat, berbenang, tak teratur, serupa akar, serupa kumpanan.
- Permukaan koloni (dilihat dari samping): rata, timbul-datar, melengkung, membukit, serupa kawah.
- Tepi koloni (dilihat dari atas): utuh, berombak, berbelah, bergerigi, berbenang, keriting.
- Warna koloni: keputih-putihan, kelabu, kekuning-kuningan atau hampir bening (Dwijoseputro, 2003).

Uji Aspek Biokimia *Zymomonas mobilis*

Uji biokimia yang dilakukan merupakan hasil modifikasi metode dari dari Lay (1994), Cappucino dan Sherman (2001), Harley dan Prescott (2002), dan Collins and Lyne (1985). Uji biokimia terdiri dari pewarnaan Gram dan endospora, kebutuhan oksigen, fermentasi karbohidrat, IMVIC (Indol-Metyl Red-Voges Proskauer-Citrat) dan uji pembentukan hidrogen sulfida, oksidase dan katalase. Sebelum melakukan pengujian, isolat bakteri sebelumnya diremajakan dalam media padat NA-HgCl₂ 10 ppm hingga diperoleh isolat yang berumur 24 jam.

Pewarnaan Gram

Preparat ulas ditetesi larutan kristal violet sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 20 detik, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya larutan iodin (Merck, Jerman) ditetaskan sebanyak 2-3 tetes di atas permukaan preparat dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikering anginkan. Larutan *etil alkohol* (Merck, Jerman) 95% ditetaskan setetes demi setetes di atas permukaan lapisan preparat sampai kristal violet tercuci dan kemudian dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Larutan safranin ditetaskan di atas permukaan kaca obyek dan didiamkan selama 20 detik, dicuci di bawah air mengalir dan dikeringanginkan. Setelah preparat ditutup dengan gelap penutup, kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 1000X dengan bantuan minyak imersi (Lay, 1994).

Pewarnaan Endospora

Preparat ulas ditempatkan pada rak pewarnaan. Preparat ulas ditutup penuh dengan kertas saring. Kemudian zat warna hijau malakit ditetaskan dengan pipet Pasteur ke permukaan kertas saring secara merata dan selanjutnya dipanaskan selama 5 menit dan didinginkan. Setelah preparat dingin, kertas saring dibuang dan preparat dibilas dengan air yang mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian preparat diwarnai dengan safranin selama 1 menit dan dibilas dengan air yang mengalir dan dikeringanginkan. Setelah ditutup dengan gelas penutup, preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dengan minyak imersi (Lay, 1994).

Kebutuhan Oksigen

Sebanyak 3 gram agar dan 29.5 gram media *thioglycollate* (Oxoid, CMO173, Inggris) dilarutkan ke dalam 1 liter akuadest dan dipanaskan diatas pemanas (Gerhard, EVI, Jerman) sampai agar larut dan homogen. Kemudian media didistribusikan ke dalam tabung reaksi sebanyak sebanyak 7 ml dan disterilisasi dalam autoklaf (Hirayama, HL 42A, Jepang) pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, tabung reaksi yang berisi media langsung dimasukkan ke dalam bak yang berisi air yang telah diatur suhunya setinggi 50°C untuk mencegah pemadatan agar. Setelah suhu media teradaptasi pada suhu 50°C yang ditandai dengan media terasa hangat-hangat kuku, kemudian satu ose isolat bakteri berumur 24 jam di inokulasikan ke dalam media tersebut secara aseptis. Tabung reaksi kemudian diputar dengan telapak tangan, agar bakteri terdistribusi merata di dalam agar. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C pola pertumbuhan isolat bakteri diamati. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh di permukaan media, maka isolat tersebut adalah aerob obligat. Apabila isolat bakteri tumbuh sepanjang kolom tabung reaksi, tetapi pertumbuhan terpekat pada permukaan agar, maka isolat adalah anaerob fakultatif. Apabila isolat bakteri tumbuh merata sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat adalah anaerob aerotoleran. Apabila isolat bakteri hanya tumbuh dibawah permukaan agar, tetapi tidak sampai sepanjang kolom tabung reaksi, maka isolat adalah mikroaeroflik. Sedangkan apabila hanya tumbuh pada dasar tabung reaksi, maka isolat adalah anaerob obligat (Harley dan Prescott, 2002, Cappuccino dan Sherman, 2001).

Fermentasi Karbohidrat

Karbohidrat yang digunakan adalah glukosa, laktosa dan manitol. Media fermentasi adalah 1% glukosa (Difco, USA), 0.5% laktosa (Difco, USA) dan 0.5% manitol (Difco, USA) yang masing-masing dilarutkan ke dalam 100 ml media cair *pepton water* (Oxoid, Inggris) yang mengandung 1 ml *bromthymol blue* 0,1% (EG-Kennzeichnung, Jerman). Selanjutnya

media fermentasi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 ml. Satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media fermentasi tersebut secara aseptis dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C (Collins and Lyne, 1985).

Uji Katalase

Satu ose isolat bakteri digoreskan secara aseptis ke kaca objek dan kemudian pada permukaannya ditetesi sebanyak satu tetes H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan timbulnya gas atau gelembung udara di sekitar goresan bakteri tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

Uji Pembentukan Hidrogen Sulfida (H₂S)

Jarum inokulasi yang ujung tajamnya mengandung isolat bakteri ditusukkan ke dalam media semi padat *Sulfide Indol Motility* (SIM) (Difco, USA) secara aseptis dan diinkubasikan selama 24 jam pada temperatur 37°C (Cappuccino & Sherman, 2001). Tes positif ditandai dengan terbentuknya endapan hitam di dalam media sebagai indikator terbentuknya H₂S. Hasil tes ini juga digunakan untuk tes motilitas. Apabila bakteri tersebut motil maka dari permukaan media, pertumbuhan bakteri terlihat melebar dan menyempit ke arah dasar tabung reaksi mengikuti arah tusukan jarum. Apabila bakteri non motil, pertumbuhan bakteri hanya terlihat pada daerah tusukan jarum saja.

Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan dengan mengoleskan biakan bakteri umur 24 jam ke permukaan kertas oksidase (Oxoid, Inggris) secara aseptis dengan tusuk gigi steril. Apabila hasil positif, maka setelah 5 detik terbentuklah warna ungu pada kertas oksidase tersebut (Harley dan Prescott, 2002).

Uji Pembentukan Indol

Satu ose isolat bakteri diinokulasikan secara aseptis ke 3 ml media cair *Trptic Soy Broth* (TSB)(Difco, USA) dalam tabung reaksi. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dan setelahnya ditambahkan 0,5 ml *Kovac's reagent* (Bioanalitika, Surabaya) (Cappuccino & Sherman, 2001). Tes positif ditandai dengan terbentuknya warna merah.

Uji Metil Merah

Satu ose biakan bakteri diinokulasikan secara aseptis pada 3 ml media cair *Methyl Red Voges-Proskauer broth* (MR-VP)(Difco, USA) di tabung reaksi dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah itu ditambahkan 2 tetes indikator *Methyl Red* (Bioanalitika, Surabaya). Hasil positif ditandai dengan perubahan warna merah pada media (Cappuccino & Sherman, 2001).

Uji Voges Proskauer

Satu jarum ose biakan bakteri diinokulasikan secara aseptis pada 3 ml media cair *MR-VP broth*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah itu ditetesi KOH 40% (Merck, Jerman) sebanyak 5 tetes dan 10 tetes *α-naftol* 5% (Merck, Jerman). Apabila hasil positif maka setelah 15 menit media berubah warna menjadi merah (*pinkish red*) (Cappuccino & Sherman, 2001).

Penentuan Efek Aerasi pada Pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

Satu ose *Zymomonas mobilis* diinokulasikan ke dalam 200 mL medium steril yang terdiri atas 100 g/l glukosa, 5 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, 1 g/l KH₂PO₄ dan 5 g/l

yeast ekstrak lalu medium ini dibagi ke dalam dua Erlenmeyer 250 mL masing-masing berisi 100 mL medium dan diinkubasi dengan perlakuan yang berbeda. Media I diinkubasi pada kondisi fermentasi temperatur 30°C dan dishaker pada kecepatan 120 rpm sedangkan media II diinkubasi pada temperatur yang sama hanya saja tidak di shaker. Media kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer tiap jam pada λ 500 nm hingga fasa kematian terjadi. Blanko yang digunakan adalah medium fermentasi steril yang tidak diinokulasi dengan *Zymomonas mobilis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

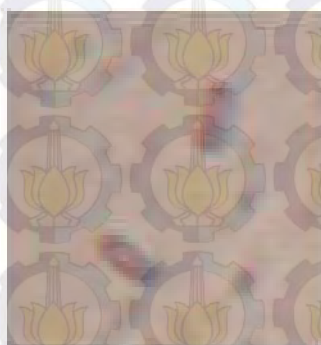
HASIL

Uji Aspek Morfologi

Aspek morfologi pada media cawan petri maupun pada agar miring dapat diamati secara makroskopis. Bentuk koloni *Z. mobilis* ZM JPG berbentuk bulat (circular) dengan tepi utuh (regular), berwarna putih dan kenaikan permukaannya berbentuk *convex* (Gambar 1). Diameter koloni setelah 2 hari sebesar 1 mm. Pertumbuhan *Z. mobilis* pada media agar miring ada yang berbentuk *filiform* atau *beaded*. Pertumbuhan ZM JPG pada media agar miring lebih mengarah pada bentuk *beaded*. Sedangkan hasil pewarnaan gram ZM JPG sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis* yakni gram negatif (Gambar 2).



Gambar 1. Bentuk koloni



Gambar 2. ZM JPG kultur 24 jam



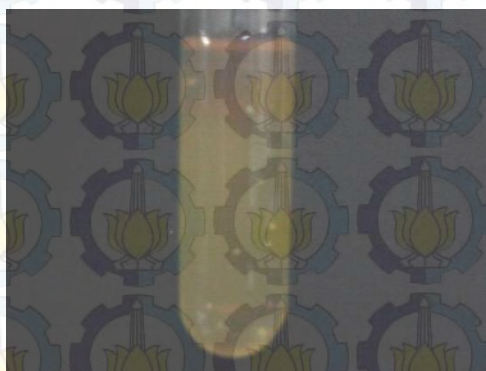
Gambar 3. Sel ZM JPG kultur 48 jam



Gambar 4. Pewarnaan spora (hasil negatif)

Bentuk dan ukuran sel *Z. mobilis* merupakan ciri yang mencolok dikarenakan lebar sel yang tidak biasa pada bakteri yakni antara panjang dan lebarnya perbandingannya tidak terlalu jauh dan apabila umur kultur lebih tua maka bentuknya akan lebih panjang akan tetapi hasil pewarnaan gramnya tidak terlalu bagus (Gambar 3). Hasil uji pewarnaan spora menunjukkan bahwa ZM JPG tidak membentuk spora sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Sel seluruhnya berwarna merah seperti halnya hasil pewarnaan gram, kalau terdapat spora seharusnya terdapat bagian berwarna hijau pada sel dengan letak tertentu. (Gambar 4).

Uji kebutuhan oksigen



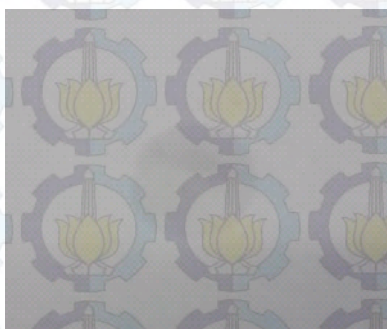
Gambar 5. Uji kebutuhan oksigen

Z. mobilis merupakan bakteri anaerob fakultatif. ZM JPG memiliki hasil uji positif bakteri anaerob fakultatif, hal ini ditunjukkan oleh pertumbuhan bakteri pada media Thioglycollate agar yang terdapat di sepanjang tabung reaksi (Gambar 5), dimana medium yang berwarna pink merupakan daerah yang memiliki oksigen sedangkan daerah medium yang berwarna kuning tidak terdapat oksigen. Perbedaan warna tersebut disebabkan oleh adanya resazurin yang akan berwarna *pink* dengan adanya oksigen dan akan tidak berwarna

dalam keadaan tereduksinya. *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen.

Uji Oksidase

Molekul organik bertindak sebagai akseptor elektron pada metabolisme fermentatif sedangkan molekul anorganik bertindak sebagai akseptor elektron dalam metabolisme oksidatif (respirasi). Dalam bakteri aerobik, sitokrom membawa elektron kepada oksigen sebagai akseptor elektron terakhir. Uji oksidase digunakan untuk menentukan keberadaan salah satu dari empat kelompok sitokrom, yakni sitokrom c (Johnson dan Case, 2004).



Gambar 6. Uji oksidase

Uji oksidase merupakan sifat khas pada *Z. mobilis*. Hasil uji oksidase pada ZM JPG negatif (tidak terjadi perubahan warna) berarti sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*. Dalam proses anaerob, senyawa organik selain oksigen bertindak sebagai akseptor elektron terakhir.

Uji Katalase

Selama respirasi aerobik, atom hidrogen dapat bergabung dengan oksigen membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat mematikan bagi sel. Kebanyakan organisme aerob menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen.

Z. mobilis sebagai bakteri anaerob fakultatif, yang tentunya dapat hidup dengan adanya oksigen, memiliki enzim katalase (Swings dan De Ley, 1977). Uji katalase pada *Z. mobilis* ZM JPG menunjukkan hasil positif dengan terbentuk buih gas oksigen pada preparat ulas yang ditetesi hidrogen peroksida 3% (Gambar 7).



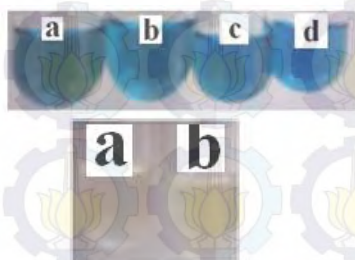
Gambar 7. Uji Katalase

Uji Fermentasi Karbohidrat

Z. mobilis menfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa melalui jalur Etner Doudoroff menghasilkan etanol, CO₂, dan sejumlah kecil produk lainnya seperti, asam asetat, asam laktat, dan gliserol serta jejak dari asetaldehid dan acetoin. *Z. mobilis* tidak tumbuh dan tidak menfermentasi pati, dekstrin, raffinose, D-trehalose, maltose, laktosa, D-cellobiosa, D-galaktosa, D-mannosa, L-sorbose, salicin, L-rhamnase, D dan L-arabinosa, D-xylose, D-ribosa, D-sorbitol, D-dulsitol, D-mannitol, adonitol, eritritol, gliserol, etanol, Na D-galakturonat, Na D-L-malate, Na suksinat, Na piruvat, Na DL-Laktat, Na tartrat atau Na sitrat (Swings dan De Ley, 1977).

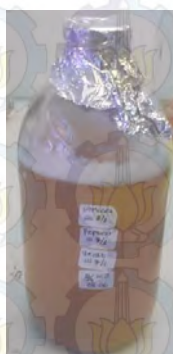
Uji fermentasi karbohidrat dalam penelitian ini dilakukan pada empat macam substrat yakni glukosa, sukrosa, laktosa dan mannitol. Uji fermentasi karbohidrat positif pada substrat glukosa dan sukrosa Gambar 8). Warna medium fermentasi perlahan berubah menjadi kuning (Gambar 8 a dan b) hal ini disebabkan oleh turunnya pH medium akibat asam organik yang dihasilkan oleh *Z. mobilis*. Keasaman ini disebabkan oleh sejumlah kecil produk fermentasi *Z. mobilis* seperti, asam asetat, asam laktat, jejak dari asetaldehid dan gas CO₂ (Swings dan

De Ley, 1977). Perubahan warna menjadi kuning lebih cepat terjadi pada medium sukrosa. Produksi etanol oleh sukrosa menurun hingga 70% dan produk samping yang dihasilkan lebih besar.



Gambar 8. Uji fermentasi karbohidrat

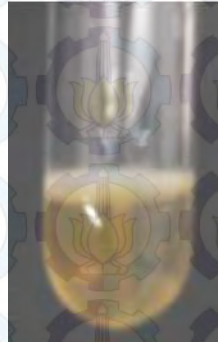
Z. mobilis menghasilkan banyak sekali gas. Tutup medium fermentasi pada botol 500 mL yang berisi 500 ml medium cair sampai terlempar ke udara ketika diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang (gambar 9). Hasil uji karbohidrat negatif pada substrat laktosa dan mannitol, ZM JPG tidak dapat tumbuh pada laktosa maupun mannitol sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*.



Gambar 9. Medium fermentasi hasil inkubasi selama 5 hari.

Uji Motilitas

Motilitas bukan merupakan ciri spesifik yang dimiliki oleh *Z. mobilis*. Tiga puluh persen *Z. mobilis* yang ada bersifat non motil (Swings dan De Ley, 1977). Hasil uji motilitas pada ZM JPG positif. Hal ini diindikasikan oleh pertumbuhan bakteri yang melebar dan terpekat pada permukaan media (Gambar 10), sedangkan bila hasilnya negatif maka pertumbuhan hanya akan terdapat pada daerah tusukan jarum inokulasi.



Gambar 10. Uji pembentukan H₂S dan motilitas

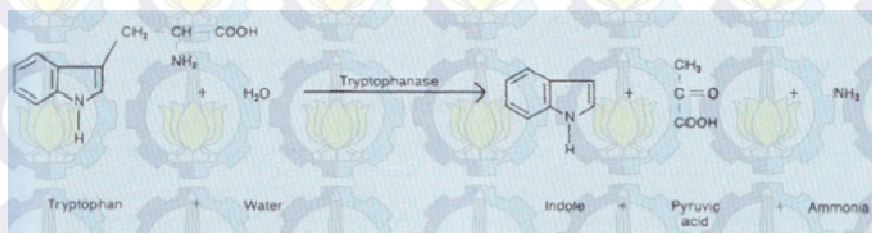
Uji Pembentukan H₂S

Uji pembentukan H₂S pada ZM JPG negatif, ini ditandai dengan tidak terbentuknya endapan hitam pada media SIM (Sulfide Indole Motility) (gambar 10). Beberapa peneliti menyatakan bahwa pembentukan H₂S oleh *Z. mobilis* dapat hilang akibat proses pengkulturan ulang dalam laboratorium. Akan tetapi, produksi H₂S merupakan sifat yang stabil pada beberapa galur, contohnya pada *Z. mobilis* NCIB 8227 dan NCIB 8938, *Zymomonas* tersebut telah dikulturkan selama bertahun-tahun dan masih menghasilkan H₂S ketika dites (Milis, 1956 dan Dadds, dkk., 1973). Empat puluh dua dari empat puluh lima *Z. mobilis* yang diteliti tidak membentuk H₂S (Swings dan De Ley, 1976).

Sumber sulfur yang biasa digunakan dalam medium sintetik antara lain: Metionin, tiamin, sulfat, sulfat dan sistein. Sumber utama H₂S yang dihasilkan oleh *Z. mobilis* dalam minuman fermentasi Bir dan *Wort* berasal dari sulfat.

Peningkatan konsentrasi sulfat antara 0-500 mg/l dapat meningkatkan produksi H₂S. Penambahan ion Zink juga dapat menstimulasi produksi H₂S. Akan tetapi, penambahan panthotenat memiliki efek yang sebaliknya, peningkatan konsentrasi pantotenat dari 0-40 µg/l menurunkan produksi H₂S (Anderson dan Howard, 1974). Berdasarkan hasil penelitian terdahulu dapat disimpulkan bahwa pembentukan H₂S bukan merupakan karakteristik yang khas bagi *Z. mobilis*.

Uji Pembentukan Indol



Gambar 11. Reaksi terbentuknya indol

Uji pembentukan indol adalah untuk menentukan apakah bakteri tersebut memiliki enzim triptopanase yang dapat melepas indol dari triptopan (Gambar 11). Indol yang terlepas akan bereaksi dengan reagen *kovac* membentuk warna kemerahmudaan (*pinkish red*). *Z. mobilis* tidak memiliki enzim triptopanase sehingga hasil uji pembentukan indolnya negatif sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis* ditandai dengan tidak terbentuknya cincin merah pada lapisan atas media. Lapisan atas media terbentuk cincin yang berwarna bening agak kehijauan (gambar 12).



Gambar 12. Hasil uji indol

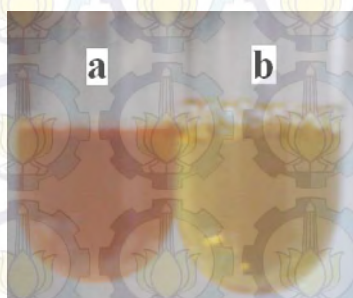
Uji Metil Merah-Voges Proskauer

Uji Metil Red-Voges Proskauer (MRVP) digunakan untuk membedakan antara organisme yang memproduksi sejumlah besar asam organik dari glukosa dan organisme yang memproduksi produk netral *acetoin*. Jika ZM JPG memproduksi sejumlah besar asam organik dari glukosa maka medium akan tetap berwarna merah ketika ditambah metil merah yang mengindikasikan hasil uji MR positif dengan pH dibawah 4,4. Jika produk netral yang dihasilkan, metil merah akan berubah warna menjadi kuning, mengindikasikan bahwa pH di atas 6,0. pH medium sebelum ditambah metil merah dicek menggunakan strip pH indikator hasilnya pH=5. Warna medium setelah ditambah metil merah ditunjukkan dalam gambar 13. Meskipun terdapat perubahan warna tapi tidak sampai merah pekat, keasaman ini disebabkan oleh sejumlah kecil produk fermentasi *Z. mobilis* seperti, asam asetat, asam laktat, jejak dari asetaldehid dan gas CO_2 (Swings dan De Ley, 1977). Hasil uji MR pada ZM JPG negatif sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis* yang terdapat dalam *bergeys manual determinology*.



Gambar 13. Uji Metil Merah

Produksi *acetoin* dideteksi dengan penambahan kalium hidroksida dan α -naftol. Jika terdapat *acetoin*, bagian atas medium akan berwarna merah (*pinkish red*); uji VP negatif akan mengubah medium menjadi berwarna coklat muda. Uji VP pada ZM JPG positif lemah ditunjukkan oleh adanya warna kemerahmudaan yang tipis pada lapisan atas (gambar 14.a). Gambar 14.b adalah medium mrvp yang tidak diinokulasi dan diperlakukan sama. *Bergeys manual determinology* menyebutkan hasil uji *Z. mobilis* negatif pada uji MR dan hasil uji VP positif tapi sangat lemah (*weakly positive*). Hal ini disebabkan *acetoin* dalam *Z. mobilis* diproduksi dalam jumlah kecil saja (*trace*) tanpa adanya aerasi. *Acetoin* dipengaruhi oleh aerasi dimana semakin banyak kadar oksigen maka *acetoin* yang dihasilkan semakin meningkat. Peningkatan produksi *acetoin* juga bisa dilakukan dengan menambahkan asetaldehid dalam medium fermentasi glukosa atau sukrosa. Dua puluh hingga 35% substrat akan diubah menjadi *acetoin*. Empat puluh dua koleksi *Z. mobilis* yang diteliti semua menghasilkan jejak asetilmetilkarbinol (*acetoin*). (Swings dan De Ley, 1977). Shimwell (1937) dan Milis (1956) memberikan hasil negatif pada uji VP kemungkinan karena kondisi tes yang berbeda, sensitivitas atau karena keduanya.



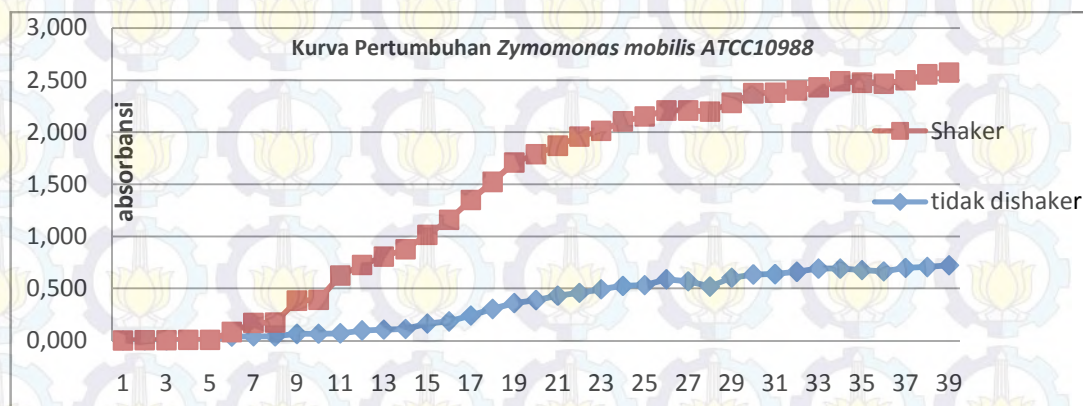
Gambar 14. Uji Voges-Proskauer

Efek aerasi terhadap pertumbuhan *Z. mobilis* ZM JPG

Zymomonas Mobilis merupakan bakteri fakultatif anaerob yang memiliki kadar toleransi terhadap oksigen yang berbeda-beda antar galur. Pengaruh aerasi diteliti pada ZM JPG dan dihasilkan kurva pertumbuhan seperti pada gambar 12.

ZM JPG mengalami fasa lag selama 5 jam baik pada medium yang diaerasi maupun yang tidak diaerasi (Gambar 15). Fase lag disebabkan oleh tingginya tekanan osmosis akibat ditumbuhkan pada medium gula dengan konsentrasi tinggi sehingga pertumbuhan sel terhambat. *Z. mobilis* mampu tumbuh dalam lingkungan dengan kadar gula tinggi akibat memproduksi sorbitol. Sorbitol memiliki fungsi fisiologis yang penting yakni memberi

osmoproteksi terhadap *Z. mobilis* (Loos, dkk., 1994). Sorbitol dihasilkan oleh enzim Glukosa-Fruktosa Oksireduktase (GFOR), enzim ini terikat kuat dengan kofaktor NADP. Enzim GFOR merupakan enzim yang unik dan saat ini baru ditemukan hanya terdapat pada *Z. mobilis*. Enzim GFOR termasuk enzim konstitutif (Zachariou dan Scopes, 1986).



Gambar 15. Kurva pertumbuhan dengan efek aerasi dan tanpa aerasi

Fase pertumbuhan diperlambat pada media yang diaerasi lebih singkat yakni hanya selama 3 jam sedangkan pada media yang tidak diaerasi fase pertumbuhan diperlambat berlangsung lebih lama yakni selama 8 jam. Aerasi membuat pertumbuhan sel lebih cepat. Organisme aerotoleran seperti *Z. mobilis* memiliki mekanisme penyingkiran turunan oksigen yang berbahaya seperti H_2O_2 . Hal ini dapat dilakukan oleh *Z. mobilis* karena terdapat enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi oksigen dan air (Swings dan De Ley, 1977). Aktivitas dari enzim katalase *Z. mobilis* tidak terpengaruh oleh aerasi (Belaich dan Senez, 1965). *Z. mobilis* juga menunjukkan aktivitas superoksida dismutase lima kali lebih tinggi dalam sel pada kultur aerobik (aerasi) daripada kultur anaerobik (tidak diaerasi). Pertumbuhan sel yang lebih cepat ketika diaerasi juga dapat disebabkan oleh kadar etanol yang dihasilkan lebih rendah pada kultur yang diaerasi sehingga hambatannya untuk tumbuh lebih kecil (Bringer, dkk., 1984). Pertumbuhan *Z. mobilis* mulai menurun ketika mencapai waktu inkubasi 48 jam (data tidak ditunjukkan). Fase kematian *Z. mobilis* yang memakan waktu lama disebabkan oleh adanya hopanoid yang dihasilkan oleh *Z. mobilis* sehingga *Z. mobilis* lebih tahan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrem.

ZM JPG dapat dieksplorasi lebih lanjut menggunakan data kurva pertumbuhan tersebut. Pengaturan metabolisme dapat dilakukan lewat pengaturan substrat dan kondisi fermentasi serta waktu pemanenan.

KESIMPULAN

Z. mobilis galur liar ZM JPG koleksi laboratorium biokimia ITS memiliki karakteristik utama sesuai dengan karakteristik *Z. mobilis*, karakteristik lain yang tidak semua *Z. mobilis* miliki akan tetapi terdapat pada ZM JPG adalah motilitas. ZM JPG termasuk *Z. mobilis* yang tidak membentuk H_2S . Aerasi membuat pertumbuhan ZM JPG meningkat dengan cepat dan membuat fase penyesuaian *Z. mobilis* lebih singkat. Hasil kurva pertumbuhan yang diperoleh dapat dieksplorasi lebih lanjut. Penelitian ini merupakan langkah awal dari eksplorasi pola

fermentasi sukrosa oleh *Z. mobilis* ZM JPG bukan hanya mengarah pada potensi etanol yang dihasilkan akan tetapi juga potensi produksi sorbitol. Sorbitol dihasilkan oleh enzim GFOR dimana enzim ini paling banyak dihasilkan apabila ditumbuhkan dalam glukosa sehingga perlu diketahui waktu pemanenan biomassa pada akhir fasa eksponensial. Waktu pemanenan inokulum ZM JPG dalam medium glukosa biomassa paling besar terdapat pada waktu inkubasi 34 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, R. J. dan G. A. Howard, (1974), "The production of hydrogen sulphide by yeast and by *Zymomonas anaerobia*", Journal Inst. Brewery, London, no. 80, hal. 245-21.
- Belaich, J. P. dan J. C. Senez, (1965), "Influence of aeration and Panthotenate on growth yield of *Zymomonas mobilis*", Journal Bacteriology, no. 95, hal. 1750-1757.
- Bringer, S., R. K. Finn dan H. Sahn, (1984), "Effect of Oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*", Archives of Microbiology, No. 139, hal. 376-381.
- Cappuccino, J.G. dan Sherman, N., (2001), "Microbiology A Laboratory Manual", Benjamin Cummings, San Fransisco.
- Collins, C. H, dan Lyne, P. M, (1985), "Microbiological Methods", Edisi kelima, Butterworth and Co.
- Daads, M. J. S dkk., (1973), "The doubtful status of the spesies *Zymomonas anaerobia* dan *Z. mobilis*", Journal App. Bacteriology, no. 36, hal. 531-539.
- De Ley dan Swings J., (1976), " Phenotype description, numerical analysis and a proposal for an improved taxonomy and nomenclature of the genus *Zymomonas* Kluvyer dan Van Niel", International Sys. Bacteriology, no. 26, hal. 146-157.
- Dwijoseputro, (2005), "Dasar-Dasar Mikrobiologi", Djambatan, Malang.
- Gunasekaran, P., T. Karunakaran dan M. Kasthuribai, (1986), " fermentation Pattern of *Zymomonas mobilis* Strains on Different Substrate-a Comparative Study", Journal Bioscience, no. 2 hal. 181-186.
- Harley dan Prescott, (2002), "Laboratory Exercises in Microbiology", McGraw-Hill Company.
- Johnson, T.R. dan Case, C.L, (2004), "Laboratory Experiments in Microbiology", seventh edition, Pearson Education inc., San Francisco.
- Lay, B., (1994), "Analisis Mikroba di Laboratorium", Raja Grafindo Persada, Jakarta.

- Milis, N. F., (1956), “ A Study of the Cider Sickness Bacillus-a new variety of *Zymomonas anaerobia*”, J. Gen. Microbiology, no. 15, halaman 521-528. Swings J and Deley J, (1977), “The biology of *Zymomonas mobilis*”, Bacteriol Rev 1977.
- Loos, H., Kramer, R., Sahm, H. dan Sprenger, G.A. (1994), “Sorbitol Promotes Growth of *Zymomonas mobilis* in Environments with High Concentration of Sugar: Evidence for a Physiological Function of Glucose-Fructose Oxireductase in Osmoprotection”, Journal of Bacteriology, Vol.176, No.24, hal 7688-7693.
- Shimwell, J. L. (1937), “ Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium* sp.nov) producing alcoholic fermentation of glucose”, Journal Inst. Brew. London, no. 43, hal 507-509.
- Zachariou, M. dan Scopes, R.K. (1986), “Glucose-Fructose Oxireductase, a New Enzyme Isolated from *Zymomonas mobilis* That Is Responsible for Sorbitol Production” Journal of Bacteriology, hal 863-869.

