UJI PRESIPITASI KALSIUM KARBONAT ($CaCO_3$) OLEH BAKTERI UREOLITIK DARI GUA KEMBAR DI KAWASAN KARST MALANG, JAWA TIMUR

SKRIPSI

Disusun Oleh:

ELIS SAFITRI

H01215004

PROGRAM STUDI BIOLOGI

JURUSAN SAINS

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA

SURABAYA

2019

PERNYATAAN KEASLIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama	: Elis Safitri
NIM	: H01215004
Program Studi	: BIOLOGI
Angkatan	: 2015

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: "**UJI KEMAMPUAN PRESIPITASI KALSIUM KARBONAT ($CaCO_3$) OLEH BAKTERI UREOLITIK DARI GUA KEMBAR DI KAWASAN KARST MALANG, JAWA TIMUR**". Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 26 Desember 2019

Yang menyatakan,

ELIS SAFITRI

NIM H01215004

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi oleh

NAMA : ELIS SAFITRI

NIM : H01215004

JUDUL : UJI KEMAMPUAN PRESIPITASI KALSIUM KARBONAT ($CaCO_3$) BAKTERI UREOLITIK YANG DIISOLASI DARI GUA KEMBAR KAWASAN KARST MALANG, JAWA TIMUR

Telah diperiksa dan disetujui untuk diujikan.

Surabaya, 26 Desember 2019

Dosen Pembimbing I	Dosen Pembimbing II
Misbakhul Munir, S.Si., M.Kes.	Hanik Faizah, S.Si., M.Si.
NIP.198107252014031002	NUP. 201409019

PENGESAHAN TIM PENGUJI SKRIPSI

Skripsi Elis Safitri ini telah dipertahankan
di depan tim penguji skripsi
di Surabaya, 26 Desember 2019

Mengesahkan,
Dewan Penguji

Penguji I

Misbakhul Munir, S.Si., M.Kes.
NIP.198107252014031002

Penguji II

Hanik Faizah, S. Si., M. Si.
NUP. 201409019

Penguji III

Ika Mustika, M. Kes.
NIP. 198702212014032004

Penguji IV

Saiful Bahri, M.Si.
NIP. 198804202018011002

Mengetahui,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Ampel Surabaya

Dr. Eni Purwati, M.Ag.
NIP 196512211990022001

KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA
PERPUSTAKAAN
Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Elis Safittri
NIM : H01215004
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/BIOLOGI
E-mail address : elis.safitri131@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :
■ Sekripsi ☐ Tesis ☐ Desertasi ☐ Lain-lain (.....)
yang berjudul :

UJI KEMAMPUAN PRESIPITASI KALSIUM KARBONAT ($CaCO_3$) OLEH BAKTERI UREOLITIK DARI GUA KEMBAR DI KAWASAN KARST MALANG, JAWA TIMUR

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Ekslusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara ***fulltext*** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 26 Desember 2019

Penulis

(Elis Safitri)

ABSTRAK

UJI PRESIPITASI KALSIUM KARBONAT ($CaCO_3$) BAKTERI UREOLITIK DARI GUA KEMBAR DI KAWASAN KARST MALANG, JAWA TIMUR

Bakteri Ureolitik merupakan bakteri yang memiliki potensi dalam mempresipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) melalui hidrolisis urea dari enzim urease yang dihasilkannya. Bakteri ini memiliki potensi sebagai agen dalam bahan konstruksi beton yang bisa memperkuat struktur beton. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji kemampuan presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) bakteri dari kawasan karst gua Kembar Kabupaten Malang, Jawa Timur. Sample tanah diisolasi dan dipurifikasi di media CCP (*Calcium Carbonate Precipitation*), selanjutnya isolat murni diuji dalam media urea agar untuk mengetahui bahwa isolat bakteri memiliki aktiviats enzim urease. Bakteri ureolitik diuji kemampuannya dalam presipitasi $CaCO_3$ diinkubasi di media cair NB-U/Ca selama 7 hari dengan suhu 30^0C pada kecepatan 130 rpm. Bakteri diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia. Hasil penelitian memperoleh 10 isolat bakteri ureolitik yang diisolasi dari gua Kembar, didapatkan enam genus bakteri ureolitik. Hasil uji kemampuan presipitasi iolat bakteri menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki kemampuan presipitasi kalsium karbonat yang bervariasi, dengan berat presipitat tertinggi dihasilkan oleh isolat ZG2c (genus *Bacillus*) dan berat presipitat terendah dihasilkan oleh isolat ZT5a (genus *Klebsiella*). Penelitian ini menunjukkan isolat bakteri ureolitik yang didapatkan dari gua Kembar memiliki kemampuan dalam mempresipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$), dengan demikian bakteri ureolitik bisa dimanfaatkan dalam memperbaiki struktur beton yang retak untuk dimanfaatkan dalam teknologi biogrouting.

Kata Kunci : Bakteri Ureolitik, Kalsium karbonat, Tanah gua, Urease

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

ABSTRACT

PRECIPITATION TEST OF CALCIUM CARBONATE ($CaCO_3$) UREOLYTIC BACTERIA FROM KEMBAR CAVE IN THE AREA KARST MALANG, EAST JAVA

Ureolytic bacteria are bacteria that have the potential to precipitate calcium carbonate ($CaCO_3$) through the hydrolysis of urea from the urease enzyme it produces. This bacterium has potential as an agent in concrete construction materials that can strengthen concrete structures. This study aims to isolate, characterize, and test the ability of the calcium carbonate ($CaCO_3$) precipitation of bacteria from the karst area of the Twin Cave in Malang Regency, East Java. Soil samples were isolated and purified in CCP (Calcium Carbonate Precipitation) media, then pure isolates were tested in urea media in order to find out that bacterial isolates had urease enzyme activity. Ureaolytic bacteria were tested for their ability to $CaCO_3$ precipitation incubated in NB-U / Ca liquid media for 7 days at 30^0C at 130 rpm. The results obtained 10 isolates of ureolytic bacteria identified in six genera of ureolytic bacteria. The results of the bacterial iolate precipitation test showed that the isolates had varied precipitation capabilities, with the highest weight of precipitate produced by isolate ZG2c (genus *Bacillus*) and the lowest weight of precipitates produced by ZT5a isolate (genus *Klebsiella*). This study shows the genus of ureolytic bacteria obtained from the Twin Cave has the ability to precipitate calcium carbonate (CaCO3), thus ureolytic bacteria can be utilized in repairing cracked concrete structures for use in biogrouting technology.

Keywords: Ureolytic Bacteria, Calcium Carbonate, Cave Soil, Urease

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR ISI

Halaman Judul i
Halaman Pernyataan Keaslian Karya Ilmiah ii
Lembar Persetujuan Pembimbing iii
Lembar Pengesahan Tim Penguji Skripsi iv
Lembar Pernyataan Persetujuan Publikasi v
Abstrak vi
Daftar Isi vii
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 5
1.3 Tujuan Penelitian 5
1.4 Manfaat Penelitian 6
BAB II KAJIAN PUSTAKA 7
2.1 Skrining Gua Kembar kawasan karst Malang untuk bakteri ureolitik 7
2.2 Bakteri Ureolitik 16
2.3 Penentuan aktivitan enzim urease 18
2.4 Isolasi dan identifikasi bakteri.....19
BAB III METODE PENELITIAN 31
3.1 Jenis Penelitian 31
3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian 31
3.3 Alat dan Bahan Penelitian 32
3.4 Prosedur Penelitian 33
3.5 Analisis Data 42

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 43
4.1 Hasil 43
4.2 Pembahasan.....52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 70
5.1 Kesimpulan 70
5.2 Saran 70
DAFTAR PUSTAKA 71

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karst adalah istilah bahasa Jerman yang telah diturunkan dari bahasa Slovenia (kras) yang memiliki arti lahan gersang yang berbatu. Namun di negaranya sendiri karst tidak berkaiatan dengan batu gamping namun lebih diartikan sebagai bentuk lahan yang dihasilkan dari proses pelarutan (Haryono dan Adji, 2004). Kondisi hidrologi di dalam karst memiliki ciri yang khas hal ini disebabkan oleh batuan yang mudah larut serta adanya porositas sekunder yang berkembang baik (Ford and Williams, 1992).

Karst memiliki dua bentukan morfologi yaitu eksokarst dan endokarst. Salah satu pembentukan dari aktivitas morfologi endokarst ini adalah gua. Umumnya gua sendiri dibentuk oleh reaksi asam karbonat dan beberapa terbentuk oleh proses speleogenesis asam sulfat (Palmer, 1991). Beberapa gua memiliki ciri khas khusus dari adanya banyak ornamen-ornamen yang terbentuk di dalamnya. Ornamen (*speleothem*) merupakan bentukan-bentukan yang dihasilkan oleh proses pelarutan dan sedimentasi. Beberapa jenis ornamen yang ada dalam gua adalah *stalactite*, *stalacmite*, *coloumn*, *drapries*, dan *flowstone* (Jennings, 1985).

Salah satu contoh gua yang memiliki bentuk fisik dengan banyak ornamen akibat aktivitas biologi maupun kimia adalah gua Kembar yang berada di kawasan karst Malang, Jawa Timur. Gua ini memiliki beberapa jenis ornamen di dalamnya seperti *moonmilk*, stalagmit, *flowstone*, *rimstone*, gourdam dan kanopi meskipun yang mendominasi adalah stalagtit (IMPALA UB, 2012).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Proses pembentukan karst hingga membentuk gua dan ornamen-ornamen di dalamnya berkaitan erat dengan proses pelarutan batu gamping atau kalsium karbonat ($CaCO_3$). Berkurang atau meningkatnya kelarutan kalsium karbonat ($CaCO_3$) dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu faktor abiotik yang meliputi evaporasi, perubahan suhu dan tekanan, sedangkan faktor biotik yang mempengaruhi adalah aktivitas presipitasi yang dilakukan oleh mikroba. Faktor biotik oleh mikroba ini memiliki pengaruh yang melebihi pengaruh abiotik di lingkungan ini sendiri (Castanier *et al*. 2000).

Aktivitas presipitasi $CaCO_3$ oleh bakteri merupakan suatu proses biomineralisasi (Tang and Dove, 1997). Presipitasi mineral karbonat 50% dibantu oleh beberapa mikroorganisme sementara mineral fosfat dibantu oleh species mikroba tertentu (Sarayu *et al.*, 2014). Presipitasi $CaCO_3$ oleh bakteri ini dilakukan melalui hidrolisis urea pada bakteri yang dipengaruhi aktivitas enzim urease (Dhami *et al*., 2014). Enzim urease bertugas mengkatalis hidrolisis urea untuk memproduksi ammonia dan ion karbonat (Mobley dan Hausinger, 1989). Ion karbonat yang dihasilkan akan dilepaskan dan mengikat ion kalsium $CaCl_2$ dengan mempresipitasikan $CaCO_3$ hingga terjadi proses sementasi dengan terbentuknya kristal $CaCO_3$ (Lee, 2003). Enzim urease ini akan meningkatkan pH melalui ammonia yang dihasilkan dari hidrolisis urea dan konsentrasi karbonat yang kemudian dikombinasikan dengan kalsium di lingkungan untuk mempresipitasi kalsium karbonat (Hammes *et al.*, 2003; Muynck *et al.*, 2010). Bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease ini disebut sebagai bakteri ureolitik. Bakteri ini mensintesis molekul organik yang ada pada dirinya melalui fiksasi karbon dioksida untuk menghasilkan sumber

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

makanan atau energi bagi mereka. Karena terbatasnya nutrisi dan energi dalam gua yang menghambat produksi bahan organik utama bagi kelangsungan hidup mereka. Bakteri-bakteri yang mampu menghidrolisis urea sebagai sumber energi mereka hingga terjadi presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) antara lain *Bacillus magaterium, Bacillus pumilis, Bacillus sphaericus, Bacillus cereus, Staphylococcus* sp., *Brevibacillus brevis, Pasteurella* sp. (Cacchio *et al*., 2003; Komala dan Khun, 2003).

Hasil isolasi bakteri oleh Febria (2015) di gua Baba Sumatera Barat dari stalaktit dalam, stalaktit luar, batu gamping, dan *flowstone* didapatkan 42 isolat bakteri. Isolat bakteri yang didapatkan merupakan bakteri yang memiliki kemampuan tumbuh dimedia B4 yang kaya akan urea, dari keseluruhan isolat tersebut terdapat 10 isolat yang memiliki kemampuan tumbuh dalam medium urea agar yang merupakan hasil isolasi dari *flowstone*, sedangkan pada penelitian Cacchio dan Ercole (2003) mendapatkan 31 isolat bakteri dari dua tempat, 22 isolat didapatkan dari stalaktit gua Stiffe dan sembilan isolat dari tanah lempung yang digunakan dalam konstruksi pembuatan batu bata diambil di dekat Alessandria (Italia Utara). Hasil pengamatan mikroskopis di bawah kondisi laboratorium dalam medium B-4 menunjukkan bahwa sebagian besar isolat (45,9% dari tanah dan 95,6% dari gua) mampu membentuk *crystalline* $CaCO_3$ salah satu isolatnya yaitu *Bacillus megaterium*.

Presipitasi kalsium karbonat merupakan fenomena umum didunia bakteri dan pada kondisi yang sesuai sebagian besar bakteri mampu mengendapkan kristal kalsit (Boquet *at al*, 1973). Kemampuan tersebut dapat dimanfaatkan bakteri dalam mengendapkan karbonat dalam restorasi batu kapur konservatif

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

di bangunan-bangunan bersejarah dan monumen sculptural (Castanier *et al*, 1999). Kemampuan bakteri ini berfungsi untuk memperbaiki retakan dalam formasi batuan khususnya di reservoir minyak (Stocks Fischer *et al*, 1999). Semua pengaplikasian ini didasarkan pada penggunaan material yang dibentuk oleh metabolisme bakteri yang terlibat dalam pembentukan batu kapur di alam.

Sesungguhnya tidak ada yang sia-sia dari apa yang telah diciptakan Allah SWT didunia ini melainkan punya manfaat sekecil apapun itu, seperti diciptakannya mikroorganisme yang ada di dalam gua pasti memiliki manfaat kepada umat manusia. Seperti halnya firman Allah dalam QS. Ali Imran/3; 191 (Departemen Agama RI, 2009) :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيٰمًا وَقُعُودًا وَعَلٰى جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِى خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بٰطِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۝

Artinya : *"(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa api neraka"*

Beberapa penelitian yang pernah dilakukan menjelaskan bahwa bakteri dari gua memiliki potensi dalam mempresipitasi $CaCO_3$ yang berperan dalam pembentukan ornamen-ornamen gua melalui aktivitas enzim urease yang dihasilkannya, meskipun dengan nutrisi yang rendah dalam lingkungan gua. Bakteri pembentuk $CaCO_3$ ini disebut sebagai bakteri ureolitik, bakteri ini memiliki kemampuan untuk menginduksi $CaCO_3$ pada jumlah tinggi dalam

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

waktu yang cepat. Kemampuan yang dimiliki bakteri tersebut dalam presipitasi $CaCO_3$ memiliki banyak manfaat, salah satunya adalah teknologi biogrouting pada bangunan serta perbaikan pada monumen batu kapur dan patung-patung. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri ureolitik pada gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur.

1.2 Rumusan Masalah

a. Jenis bakteri ureolitik apa sajakah yang diisolasi dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur ?

b. Bagaimana kemampuan presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) dari isolat bakteri ureolitik yang diperoleh dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur?

1.3 Tujuan Penelitian

a. Mengetahui jenis bakteri ureolitik yang diisolasi dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur

b. Mengetahui kemampuan presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) dari isolat bakteri ureolitik yang diperoleh dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai jenis bakteri ureolitik dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur yang memiliki kemampuan presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$). Informasi ini juga bertujuan sebagai acuan dalam pemanfaatan bakteri ureolitik dalam teknologi biogrouting sebagai *self-healing concentrate* dalam perbaikan beton yang retak atau sebagai campuran untuk memperkuat struktur beton.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB II
KAJIAN PUSTAKA

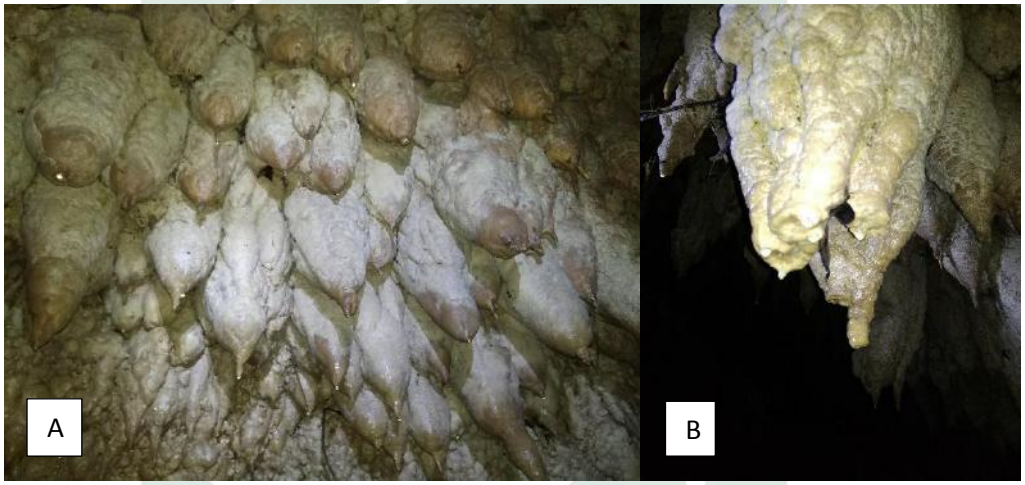
2.1 Skrining Gua Kembar Kawasan Karst Malang Untuk Bakteri Ureolitik

Gambar 2.1 Kolam yang berada di zona gelap Gua Kembar
Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2019

Gua Kembar merupakan salah satu gua yang terletak di Desa Kedungsalam, Kecamatan Donomulyo, Kabupaten Malang yang berada pada titik koordinat LS 08° 20’ 56,34” BT 112° 26’ 53,48” dan elevasi 210 mdpl. Disebut sebagai gua Kembar karena memiliki 3 mulut gua yang berdampingan. Gua Kembar ini terletak di kawasan hutan produktif perhutani (KPH) Malang. Vegetasi yang ada disekitar gua Kembar adalah hutan pohon Jati, pisang dan ketela pohon. Lokasi gua Kembar berada dilembah memanjang (karst labirin), yang di dalamnya terdapat gua Sio, gua Maron, gua Kerek dan gua Buntet serta memiliki dua cekungan Dolina yang masing-masing ada mulut gua Kembar (IMPALA UB, 2012).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Mulut Kembar 1 memiliki lebar sekitar 15 meter dengan tinggi langit-langit 7 meter. Kembar 1 merupakan suatu cekungan yang runtuh, dilantai nya terdapat bongkahan batu (*boulder*), kerikil dan lumpur. Kembar 2 memiliki lebar sekitar 12 meter dan tinggi langit-langit 7 meter, sedangkan pada Kembar 3 memiliki ukuran yang lebih kecil dari pada Kembar 1 dan Kembar 2. Semua mulut gua ini terhubung dengan ruangan yang besar (*chamber*) (IMPALA UB, 2012).



Gambar 2.2 Beberapa ornamen-ornamen yang ada di Gua Kembar (A) stalagtit dan (B) soda straw

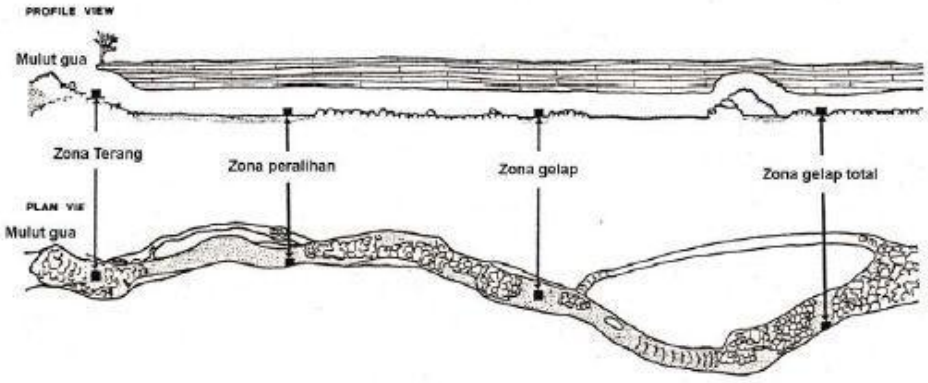
Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019

Gua Kembar merupakan salah satu jenis gua horisontal dan sungai tanah musiman. Gua ini memiliki panjang 181,17 meter dengan kedalaman air anatara 0,2 meter sampai 1,5 meter. Aliran air mengalir dari arah timur ke selatan, memiliki endapan pasir, lumpur, dan kerikil pada lantai gua. Ornamen di Gua Kembar didominasi oleh stalaktit dengan panjang yang hampir menyentuh lantai, namun ada juga ornamen lain seperti *moonmilk*, stalagmit, *flowstone*, *rimstone*,gourdam dan kanopi (IMPALA UB, 2012).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

1. Karst dan Pembentukan Goa

Karst merupakan bentangan alam yang dibentuk oleh batuan kapur. Luas karst di Indonesia sendiri sekitar 15,3 juta hektar atau 20% dari total luas di Indonesia. Karst memiliki keunikan ekosistem yang terdiri dari endokarst dan eksokarst yang nantinya akan membentuk gua-gua (Rahmadi, 2007). Eksokarst sendiri merupakan bagian permukaan yang terdiri dari mata air karst, bukit karst, dolina, uvala, polje dan telaga sedangkan endokarst terletak dibagian bawah permukaan yang terdiri dari mata air bawah tanah dan speleotem (Haryono dan Adji, 2004). Gua sendiri terkenal memiliki ciri ekosistem dengan lingkungan yang gelap, memiliki fluktuasi suhu, oksigen, dan ketersediaan energi, hal ini menjadikan gua sebagai habitat yang unik untuk mikroorganisme (Barton *et al*, 2004).



Gambar 2.3 Profil gua menunjukkan pembagian berbagai tipe zona gua (Modifikasi dari Howarth, 1980)

Goa dibagi menjadi beberapa zona yag berbeda berdasarkan pada intensitas cahaya dan suhunya (Mohr dan Paulson, 1996). Menurut Paulson dan White (1969) setiap goa memiliki tiga zona yang berbeda yaitu (i) zona terang yang terletak didekat pintu masuk;

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

(ii) zona tengah dimana relatif cahaya yang masuk sedikit sehingga keadaan di goa mulai gelap; (iii) zona gelap dimana kegelapan total dan suhu konstan mulai berlaku (Koilraj dan Marimuthu, 1999).

Gua terbentuk dengan beberapa pengaturan geologi, termasuk dari lava, es glasial, tufa vulkanik, lumpur, marmer, bahkan tumpukan batu besar (talus). Namun seringkali gua terbentuk dari peleburan batu kapur ($CaCO_3$) batuan yang terdiri dari asam lemah dari air hujan, serta terbentuk dipermukaan. Meskipun begitu terkadang tetap sulit untuk mengidentifikasi. Untungnya karena dedikasi para penjelajah gua dengan petujuk geologis mereka mampu menemukan gua-gua (Barton dan Juardo, 2007).

Terbentuknya gua terdiri dari beberapa jenis karbon seperti kalsit ($CaCO_3$) dan yang masih satu komposisi aragonit juga $CaCO_3$, dolomit ($CaMg(CO_3)_2$) gua dengan komposisi seperti itu digolongkan dalam goa jenis umum (Ford dan williams, 1989). Air jenuh CO_2 masuk kedalam gua dan mengenai atmosfer gua, air yang masuk ini dapat menyeimbangkan dengan lingkungan mereka. Sehingga pengendapan kalsit atau mineral lain terjadi dengan cara melepaskan CO_2. Kalsit dan aragonit membentuk 95% semua gua mineral yang ada (Gillieson, 1996). Presipitat ini menciptakan berbagai formasi gua yang disebut speleothems di dalam bagian gua.

Sebagian besar juga gua terbentuk oleh asam karbonat yang dibentuk oleh beberapa proses yang disebut speleogenesis asam sulfat (Palmer, 1991). Mikroorganisme yang berhubungan dengan gas alam dan

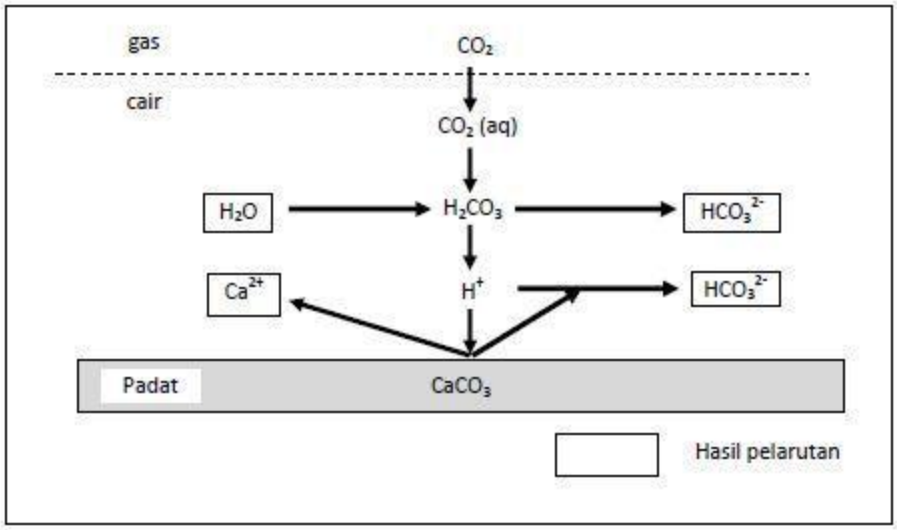
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

endapan minyak bumi dapat mengurangi asam sulfat (SO_4) atau senyawa sulfat seperti anhidrit gipsum ($CaSO_4$) menjadi hidrogen sulfida dalam kondisi anaerobik (Orr, 1977).

2. Presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) oleh mikroba

Karstifikasi merupakan proses pelarutan dan proses korosi secara kimiawi yang disebabkan oleh air pada batuan gamping, gipsum, batu garam atau batuan lain yang menyebabkan terbentuknya eksokarst dan endokarst (Summerfield, 1991).

Proses pelarutan batu gamping juga dijelaskan oleh Trudgil (1985)



Gambar 2.4 Proses pelarutan batugamping
Sumber : Trudgil, 1985

Pembentukan karst didominasi oleh pelarutan. Proses awal dari pelarutan sendiri yakni melarutnya CO_2 di dalam air sehingga terbentuk H_2CO_3 (Maulana, 2011). Larutan H_2CO_3 mengalami ketidakstabilan dalam penguraiannya menjadi H^- dan HCO_3^{2-}. Selanjutnya penguraian dilakukan oleh ion H^- untuk menguraikan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

$CaCO_3$ menjadi Ca^{2+} dan HCO_3^{2-}. Dari proses tersebut dijelaskan dalam reaksi kimia sebagai berikut :

$$CaCO_3 + H_2O + CO_2 \longrightarrow Ca^{2+} + 2HCO_3^{2-}$$

Proses karstifikasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya faktor pendukung dan faktor pengontrol (Haryono dan Adji, 2004). Faktor pengontrol bertujuan untuk mengetahui bisa atau tidaknya karstifikasi berlangsung. Sedangkan faktor pendukung berfungsi dalam menentukan kecepatan dan kesempurnaan proses karstifikasi.

Faktor pengontrol :

1. Batuan mudah larut, kompak, tebal, serta punya banyak rekahan.
2. Curah hujan cukup (>250 mm/tahun)
3. Batuan uang telah terekspos di ketinggian yang memilki potensi dalam perkembangan sirkulasi air atau drainase secara vertikal.

Faktor pendorong:

1. Temperatur
2. Penutupan hutan atau vegetasi yang lebat

Jika dilihat dari proses kimia yang membentuk karbondioksida (CO_2) memiliki peran penting dalam proses pelarutan batu gamping. Karbondioksida (CO_2) dan air (H_2O) berperan sebagai reaktan untuk membentuk ion H^- yang berfungsi melarutkan batuan-batuan karbonat. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi karbondioksida maka akan semakin melarutkan karbonat (Haryono dan Adji, 2004).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Sumber karbondioksida berasal dari atmosfer yang ada ditanah. Sedangkan karbondioksida yang berasal dari tanah tersebut berasal dari proses pembakaran bahan bakar fosil yang mengalami oksidasi oleh mikroorganisme tanah (Lassard *et al*, 1994).

Oksidasi yang dilakukan oleh mikroorganisme dan respirasi berpengaruh pada dinamika karbondioksida (CO_2) dalam tanah pada kawasan karst. Proses karstifikasi ini secara tidak langsung memilki dampak positif yakni memanfaatkan karbondioksida (CO_2) yang ada dalam tanah ke atmosfer sehingga karbondioksida (CO_2). Berkurangnya intensitas karbondioksida (CO_2) dapat mengurangi pemanasan global yang disebabkan oleh gas rumah kaca karbondioksida (CO_2). Proses karstifikasi merupakan salah satu proses penting dalam pembentukan bentang alam karena terjadinya penyerapan karbondioksida (CO_2) dalam intensitas yang cukup besar (Shengyou dan Shiyi, 2002).

3. Diversitas bakteri dalam gua

Mikroba yang berada didalam gua beradaptasi dengan mineral di sana. Beberapa proses-proses ini membentuk kembali struktur mineral dinding gua, lantai, dan langit-langit. Misalnya, dengan membentuk speleothems seperti stalaktit dan stalagmit. Saat air merembes melalui tanah diatas gua menjadi jenuh karena konsentrasi CO_2 menciptakan karbon asam lemah yang bereaksi dengan batu gamping dengan cara melarutkan $CaCO_3$. Saat air masuk gas atmosfer gua mulai melarutkan $CaCO_3$ sehingga mengalami pengendapan untuk menghasilkan formasi yang indah (Barton dan Jurado, 2007).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Spesies mikroba yang terdapat dalam gua yang telah ditemukan dalam penelitian Barton dan Jurado (2007) dapat memobilisasi fosfat anorganik, mengoksidasi metana dan hidrogen, serta memperoleh energi dengan cara menghidrolisis protein, lipid, dan makromolekul lain dalam tubuh mikroba. Setelah dilakukan identifikasi terkait sumber energi didalam gua peneliti mulai mengeksplorasi komunitas mikroba yang ada didalam goa.

Temperatur udara yang terdapat digua terkadang memiliki tekanan yang tinggi dan kadang rendah. Hal ini dipengaruhi sistem cuaca yang bergerak diatas gua. Adanya pertukaran udara yang masuk dalam gua dapat menyeimbangkan temperature didalamnya. Sistem gua yang lebih besar memiliki kecepatan udara 80 mil per jam. Oleh karena itu pada pengecualian tertentu didalam gua tidak mengalami kekurangan gas atmosfer didalamnya.

Nitrogen merupakan nutrisi terbatas di gua meskipun persyaratan energi tinggi untuk fiksasi nitrogen, beberapa peneliti mengidentifikasi besar porsi nitrogen dan nitrifikasi spesies dalam populasi mikroba gua (Barton dan Jurado, 2007). Ketika spesies mikroba terinduksi presipitasi $CaCO_3$ mereka terperangkap didalam matriks mineral yang tersimpan didalamnya. Namun tidak dijelaskan bagaimana adaptasi ini memberikan keuntungan selektif apa pada spesies ini. Tapi karbonat yang ada didalamnya berperan penting dalam *buffering* pada proses metabolik dari spesies mikroba dan mampu melarutkan material karbonat bahkan saat $CaCO_3$ mengendap (Barton dan Jurado, 2007).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Gua Mammoth, Kentucky adalah tempat dari sebuah studi pada tahun 1989 untuk menentukan kepadatan dan keragaman sel mikroba dalam gua terpanjang di dunia (Rusterholtz dan Mallory, 1994). Peneliti menggunakan media dengan nutrisi yang tinggi dan nutrisi rendah untuk isolasi koloni bakteri. Koloni yang ada pada media padat biasanya kecil, bundar, dan putih keputihan. Sel pada umumnya memilki batang pendek atau coccobacilli. Pewarnaan Gram mengungkapkan mayoritas dari isolat yang ada adalah gram positif atau *variable* gram.

Isolat yang didapatkan dari Gua Mammoth 92% tumbuh pada pH 9 dan banyak yang mampu tumbuh pada konsentrasi NaCl setinggi 7,5%. Strain bakteri diisolasi di media dengan nutrisi yang rendah menunjukkan lebih banyak fleksibilitas sumber karbon ketika diuji untuk pemanfaatan sumber karbon tunggal. Semua strain yang dievaluasi menggunakan 11% selulosa sebagai sumber karbon tunggal dan 62% di selobiose. Produk degradasi selulosa ini bisa menjadi metabolisme yang berguna dalam lingkungan dimana sumber karbon organik terbatas dan materi tanaman sering diperkenalkan saat hujan.

Studi kultur tradisional tanah telah mengisolasi spesies bakteri dari *Clostridium, Bacillus, Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Micrococcus, dan Pseudomonas genera*. Genus lain yang biasa ditemukan adalah *Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Caulobacter, Flavobacterium, Hyphomicrobium, Metallogenium, Sarcina, Staphylococcus, Streptococcus,* dan *Xanthomonas* (Alexander, 1977; Atlas dan Bartha, 1993; Tate, 1995). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

banyak bakteri gua juga ditemukan di tanah dan sedimen permukaan termasuk *Actinomycetes, Nocarioform*, dan *Bacillus* spp. (Hoffman, 1989).

Telah diketahui bahwa bakteri gua memainkan peran penting dalam pembentukan karst, kualitas perairan akuifer, bioremediasi, dan tentu saja dalam produksi primer untuk mendukung ekosistem gua (Hoffman, 1989). Telah diketahui untuk beberapa waktu bahwa mikroorganisme gua dapat berpartisipasi dalam pengendapan mineral, baik secara pasif dengan bertindak sebagai situs nukleasi (Went, 1969), atau aktif melalui produksi enzim atau zat yang menyebabkan pengendapan oleh perubahan lingkungan mikro.

2.2 Bakteri Ureolitik

Bakteri yang memiliki kemampuan presipitasi $CaCO_3$ dalam kondisi yang sesuai merupakan jenis bakteri ureolitik Beberapa ulasan terkait bakteri yang mampu menginduksi presipitat $CaCO_3$ oleh Sarayu *et al*. (2014), bakteri-bakteri yang telah dilaporkan untuk menginduksi presipitat $CaCO_3$ didentifikasi sebagai *Pseudomonas putida, Arthrobacter sp., Desulfovibrio desulfuricans, Phormidium crobyanum dan Homoeothrix crustaceans* (Sarayu *et al*., 2014). Dari empat puluh satu bakteri, hanya sedikit yang diketahui menghasilkan enzim urease. Sebagian besar bakteri penghasil urease yang telah dilaporkan menginduksi presipitat $CaCO_3$ dan telah digunakan untuk aplikasi MICP adalah genus *Bacillus*. Bakteri ureolitik yang telah dilaporkan dalam literatur untuk aplikasi MICP adalah *Bacillus sphaericus* dan *Sporosarcina pasteurii* digunakan untuk mengatasi keretakan beton (De-Belie

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dan De-Muynck, 2008, Ramachandran et al., 2001, De-Muynck et al., 2008); *Bacillus pseudifirmus* dan *Bacillus cohnii* digunakan pada permukaan beton (Jonkers dan Schlangen, 2007, Jonkers, 2007); dan *Bacillus cereus* dan *Shewanella* sebagai mortar semen (Achal et al., 2011, Achal dan Pan, 2011, Ramachandran et al., 2001).

Salah satu bakteri ureolitik yang paling kuat adalah *S. pasteurii*. Ini adalah bakteri berbentuk batang aerob, membentuk spora. Ia menggunakan urea sebagai sumber energi dan menghasilkan amonia yang meningkatkan pH di lingkungan dan menghasilkan karbonat, menyebabkan Ca^{2+} dan CO_3^{2-} diendapkan sebagai $CaCO_3$ (Stocks-Fischer, et al., 1999 ; Kroll, 1990).

Bakteri Ureolitik memberikan keuntungan pada formasi batu pasir untuk mengkonsolidasikan material lepas, sangat penting untuk menjaga permeabilitas sampel yang disemen sehingga air bergerak melalui rongga di batu. Hal ini akan berfungsi menghambat kerusakan akibat pencatatan air oleh kultur sementasi. Retensi permeabilitas terbukti dengan absorbansi air yang direkam dalam permukaan biocemented (Tiano et al., 1999).

Sel-sel bakteri yang sudah teridentifikasi dengan jelas bisa digunakan kembali 2-3 kali (Whiffin, 2004) dan lebih dari 20 kali (Al-Thawadi, 2008) dalam aplikasi kalsium dan urease saja. Oleh karena itu, menggunakan kembali sel in-situ adalah proses penghematan biaya karena biaya kultur sel tidak dipertimbangkan. Selain itu, konsolidasi media berpori dapat dicapai dengan penggunaan langsung kultur bakteri tanpa perlu membuat konsentrasi tertentu dari sel bakteri ureolitik atau ekstrak urease dari bakteri. Dengan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

demikian, tidak perlu pengolahan tambahan untuk kultur bakteri untuk menghasilkan batu pasir.

Gambar 2.5 Gambar mikroskopis ringan kristal Kalsit yang diproduksi oleh bakteri ureolitik yang mengikat dua partikel pasir
Sumber : Al-Thawadi, 2008

2.3 Penentuan aktivitas enzim urease

Urease dan substratnya urea merupakan tonggak penting dalam suatu penelitian awal ilmiah (Mora dan Arioli, 2014). Urease diproduksi oleh banyak spesies bakteri beragam yang termasuk flora normal dan non-patogen (Mobley, 2001). Enzim urase bertanggung jawab untuk mengkatalisis hidrolisis urea untuk menghasilkan ion amonia dan karbonat (Mobley dan Hausinger, 1989). Mikrobial ureases adalah *metalloenzymes* multi-subunit yang menghidrolisis substrat urea untuk membentuk asam karbonat dan dua molekul amonia (Mobley *et al*., 1995). Degradasi urea memberikan amonium kemampuan untuk mengintegrasi ke dalam metabolit intraseluler dan memungkinkan kelangsungan hidup mikroorganisme di lingkungan asam (Collins dan D'Orazio, 1993, Mobley *et al*., 1995).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Aktivitas Urease (UA) adalah aktivitas hidrolisis urea yang dihasilkan oleh enzim urease per menit (Alhour, 2013). Pengaturan aktivitas enzim sangat penting untuk efisiensi energi dalam fungsi sel, namun tidak semua enzim wajib beraktivitas sepanjang waktu dan sintesisnya dapat berubah menjadi "off" (ditekan) atau "on" (diinduksi) tergantung ada atau tidak adanya metabolit (Whiffin, 2004). Jenis kontrol genetik ini sering diatur oleh sel pada tingkat transkripsi dimana RNA messenger dihasilkan dari templat DNA (Ratledge, 2001; Lewin, 1994).

Bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease akan menunjukkan perubahan warna pada medium uji aktivitas enzim urease dari warna kuning menjadi merah muda. Perubahan warna yang terjadi menjadi dasar penetuan adanya aktivitas enzim urease oleh bakteri. Perubahan warna mengindikasikan perubahan pH 7,0 (normal) yang di uji dengan indikator *phenol red*. Perubahan pH ini merupakan aktivitas dari bakteri yang menghasilkan enzim urease yang mampu menghidrolisis urea dan ammonia (NH_3) sebagai hasil dari aktivitas ureasenya. Berubahnya media yang mulanya berwarna kuning menjadi pink atau merah muda merupakan peningkatan pH menjadi basah (Gusmawati dkk, 2001).

2.4 Isolasi dan identifikasi bakteri

Banyaknya mikroorganisme baik ditanah, udara, air bahkan di tubuh makhluk hidup sangat beragam. Mereka berada dalam populasi campuran baik dari yang patogen maupun non-patogen. Maka dari itu dilakukan isolasi dan identifikasi untuk mendapatkan spesies bakteri atau mikroorganisme

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

yang kemudian dilakukan penelitian lebih lanjut (Waluyo, 2004). Ada beberapa teknik isolasi dan penanaman mikroba yang digunakan.

1. Teknik isolasi dan penanaman bakteri

   a. *Spread plate method* (metode cawan sebar/ tebar)

      Tekni *spread plate* merupakan teknik isolasi mikroba dengan cara mengambil kultur bakteri dalam jumlah tertentu kemudian meratakan menggunakan batang *spreader*.

   b. *Pour plate method* (metode cawan tuang)

      Teknik *pour plate* merupakan teknik isolasi bakteri dengan cara menuangkan suspensi bakteri pada media yang belum memadat pada suhu (>45^{0}C), hal ini bertujuan agar bakteri bisa tumbuh tidak hanya di permukaan namun juga di dalam medium agar, supaya ada bakteri yang tumbuh di kondisi kaya akan O_2 dan pada kondisi minim O_2.

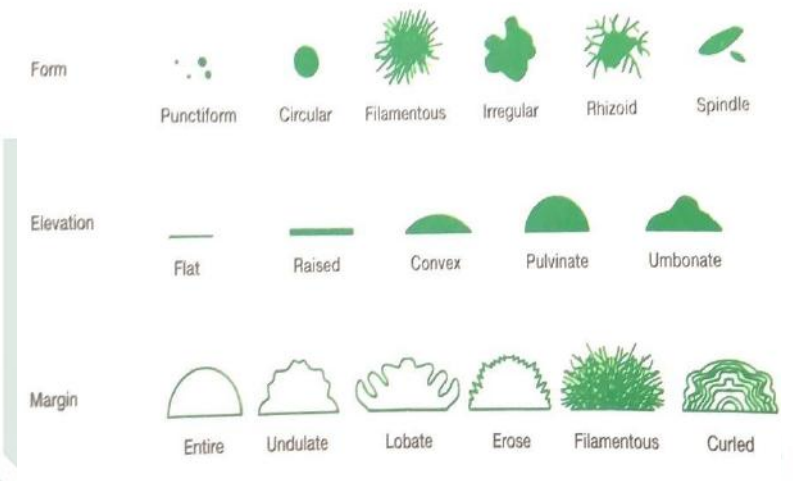
   c. *Streak plate methode* (metode cawan gores)

      Teknik cawan gores merupakan teknik isolasi bakteri yang umumnya digunakan untuk memisahkan bakteri jenis satu dengan yang lain yang biasanya digunakan untuk memurnikan suatu isolat bakteri dan meremajakan. Teknik ini yaitu mengambil suspensi bakteri menggunakan jarum ose secara aseptis dan digoreskan dipermukaan media agar (Jutono dkk, 1980).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

2. Identifikasi bakteri

a. Makroskopis



Gambar 2.6 Morfologi koloni bakteri dari bentuk koloni, elevasi, dan tepi koloni
Sumber: Prescott *et al*, 2005

1) Ukuran

Bakteri memiliki ukuran yang berbeda-beda antara lain titik, kecil, moderat atau sedang, dan besar.

2) Pigmentasi (warna koloni)

Setiap spesies bakteri meiliki variasi warna yang berbeda menjadi salah satu kunci identifikasi warna-warna koloni bakteri yaitu putih, kuning, merah, ungu, dan lain-lain.

3) *Form* (bentuk koloni)

Bentuk koloni bakteripun bermacam-macam ada yang berbentuk *circular* (bulat, bertepi), *irreguler* (tidak beraturan,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

bertepi), dan *rhizoid* (bentuk seperti akar, pertumbuhan menyebar).

4) *Margin* (tepi koloni)

Koloni bakteri memiliki tipe *margin* yang berbeda-beda seperti *entire* (tepian rata), *lobate* (tepian berlekuk), *undulate* (tepian bergelombang), *serrate* (tepian bergerigi), dan *filamentous* (tepian seperti benang-benang).

5) Elevasi

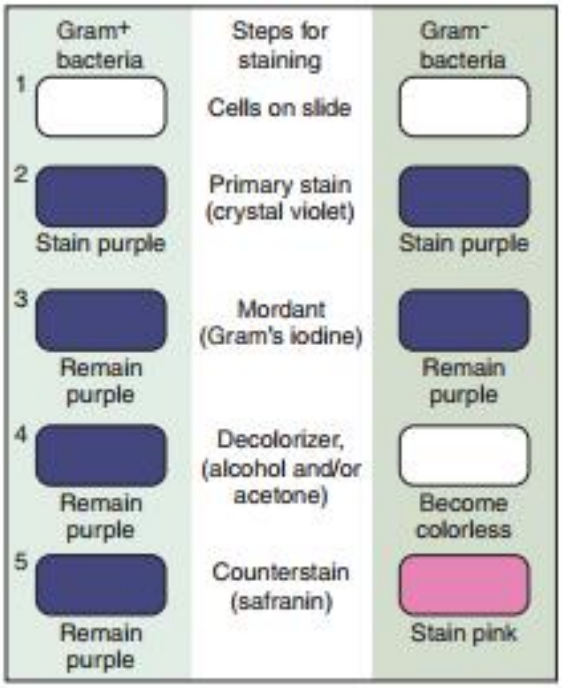
Pengukuran elevasi pada koloni diperlukan untuk mengetahui ketinggian pertumbuhan koloni bakteri. Beberapa diantaranya elevasi pada koloni bakteri yaitu *flat* (ketinggian tidak teratur, jika dilihat hampir rata dengan medium), *raised* (ketinggian benar-benar terlihat, namun rata pada seluruh permukaan), *convex* (bentuk cembung seperti tetesan air), dan *umbonate* (bentuk cembung dan pada bagian tengah terlihat lebih cembung).

b. Pewarnaan Gram

Identifikasi bakteri secara mikroskopik merupakan pengamatan bakteri di bawah mikroskop melalui pewarnaan gram. Pengamatan mikroskopis melalui pewarnaan gram ini bertujuan mengetahui bentuk dan ukuran bakteri yang sangat kecil (berukuran mikroskopis) yakni rata-rata berukuran lebar

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

0,5-1 mikron dan panjang hingga 10 mikron (1 mikron = 10^{-3}mm), karena ukurannya yang sangat kecil itu dibutuhkan zat warna yang bisa mengisi tubuhnya agar bisa diamati bentuknya (Koes Irianto, 2007).



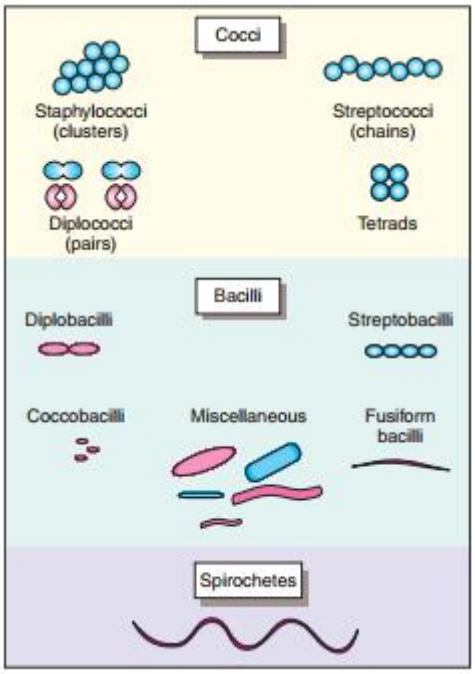
Gambar 2.7 Prinsip dan Prosedur Pewarnaan Gram
Sumber : Bailey and Scott, 1994

Christian Gram seorang ahli bakteriologi Denmark menemukan suatu pewarnaan bertingkat yang dinamakan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dibagi menjadi dua kelompok, yakni bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif berwrna ungu yang disebabkan oleh kompleks warna kristal violet-iodium yang tetap dipertahankan meskipun diberi zat peluntur (dekolorisasi). Sedangkan Gram negatif berwarna merah disebabkan oleh kompleks warna larut

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

saat dilakukan proses dekolorisasi yang kemudian mengambil warna pada zat warna kedua yang berwarna merah yakni safranin. Perbedaan yang tersebut disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel kedua bakteri tersebut (Lud Waluyo, 2008).

Bakteri gram negatif memiliki 3 lapisan dinding sel. Lapisan terluar terdiri dari lipopolisakarida (lipid) kemungkinan tercuci alkohol saat proses dekolorisasi, sehingga pada saat diwarnai menggunakan safranin akan berwarna merah. Bakteri gram positif memiliki satu lapis sel berupa peptidoglikan yang tebal. Setelah diwarnai menggunakan kristal violet pori-pori dinding sel menyempit akibat proses dekolorisasi, sehingga saat dilakukan pewarnaan menggunakan safranin tetap mempertahankan warna ungu (Hidayat *et al*, 2008).



Gambar 2.8 Morfologi sel bakteri dari pewarnaan Gram

Sumber : Bailey and Scott, 1994

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tiga bentuk tipe yang umum yaitu berbentuk bulat (*coccus*), berbentuk batang (*bacil*), dan berbentuk spiral atau spirillium. Pengamatan secara mikroskopis ini menggunakan pewarnaan gram positif dan gram negatif.

c. Uji Aktivitas Biokimia

Uji biokimia didasarkan pada kemampuan metabolisme yang disebabkan oleh daya kerja enzim dari masing-masing bakteri. Karena identifikasi bakteri tidak cukup hanya dengan mengetahui bentuk makroskopis atau mikroskopis suatu bakteri saja, namun sifat biokimia dari suatu bakteri juga sangat menentukan genus atau spesies suatu bakteri (Bibiana, 1994).

Uji biokimia yang biasa dilakukan adalah uji katalase, uji fermentasi karbohidrat, uji oksidase, uji H_2S, uji protease, dan uji indol (Cappucino dan Sherman, 1987).

Menurut Bibiana (1994), uji biokimia suatu bakteri terdiri atas :

1. Uji H_2S

Uji H_2S digunakan untuk mengetahui adanya enzim desulfurase pada bakteri yang dapat menguraikan asam amino sistein menjadi asam disulfida (H_2S). Sistein merupakan merupakan asam amino yang mengandung sulfur dan tidak terkandung dalam semua protein. Pada kondisi anaerobik, sistein mula-mula akan dipecah menjadi 2 molekul sistein dan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

kemudian sistein akan dipecah menjadi H_2S, ammonia, asam asetat dan asam format. Sedangkan pada kondisi aerobik, sistein akan mengalami disimilasi dan menghasilkan H_2S (Salle, 1961).

2. Uji Katalse

Enzim katalase merupakan enzim yang berfungsi untuk mengakatalisasikan penguraian hydrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan O_2. Hydrogen peroksida bersifat toksik karena dapat menginaktivasikan enzim dalam sel. Hydrogen peroksida terbentuk saat proses metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dilingkungan aerob harus menguraikan bahan toksik tersebut.

Uji katalase berguna dalam identifikasi kelompok bakteri tertentu pada bakteri berbentuk *coccus*, uji katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Kelompok bakteri *Staphylococcus* bersifat katalase-positif dan *Streptococcus* bersifat katalase-negatif.

Mekanisme enzim katalase dalam memecah H_2O_2 yaitu pada saat melakukan respirasi, bakteri menghasilkan berbagai macam komponen salah satunya H_2O_2, bakteri yang memiliki kemampuan dalam memecah H_2O_2 dengan enzim katalase akan membuat pertahanan dari toksik H_2O_2 yang dihasilkan oleh

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

metabolismenya sendiri. Bakteri katalase positif akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 yang ditunjukkan dengan adanya gelembung-gelembung oksigen yang terbentuk.

3. Uji Fermentasi Gula

Uji fermentasi gula merupakan suatu uji yang digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasi gula. Uji fermentasi gula ini yakni dengan media gula sukrosa, laktosa, dan glukosa dengan konsentrasi 1% dalam pepton water. Masing-masing media gula-gula ditambahkan indikator *phenol red* sehingga media berwarna merah. Hasil positif (+) dari uji ini yaitu ditunjukkan pada berubahnya warna media yang merah menjadi berwarna kuning serta sebagian membentuk gas yang artinya mikroorganisme mampu memfermentasikan gula. Sedangkan hasil negatif (-) ditunjukkan dengan warna media yang tetap berwarna merah (Adam, 2001).

4. Uji MIO (*Motilty Indole Ornithin*)

Uji ini menggunakan media semi solid dengan media MIO (*Motilty Indole Ornithin*) untuk mengetahui motilitas bakteri, kemampuan bakteri dalam membentuk *indole* dan *ornithin*. Bakteri yang motil ditandai dengan pertumbuhan bakteri menyebar dari garis tusukan, sedangkan bakteri yang non-motil hanya tumbuh pada daerah bekas tusukan saja. Uji indole dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

menghasilkan indol dari trypthopan. Pengujian dilakukan dengan menambahkan 5 tetes *reagen kovacs* pada bakteri pada media MIO yang telah diinkubasi selama 1x24 jam. Indole positif ditandai dengan terbentuknya lapisan tipis cincin merah antara medium dan reagen. Pembentukan ornithin ditandai dengan terjadinya perubahan warna medium menjadi kuning.

5. Uji Sitrat

Uji sitrat merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan sitrat sebagai sumber energi. Medium yang digunakan dalam uji ini adalah medium *Simmons Citrate Agar* (SCA) yang merupakan medium sintetik yang terdiri dari Na sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon, NH^{4+} sebagai sumber N dan *bromthynol blue* sebagai indikator pH. Apabila bakteri mikroorganisme mampu menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium, sehingga pH akan meningkat dan mengubah warna dari hijau menjadi biru (Lay, 1994).

6. Uji MR (*Methyl Red*)

Uji *Methyl Red* merupakan suatu uji yang digunakan untuk menentukan adanya fermentasi asam campuran. Beberapa bakteri akan memfermentasikan glukosa dan menghasilkan berbagai produk yang bersifat asam sehingga pH media pertumbuhannya akan turun menjadi 5.0 atau lebih rendah.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Methyl Red berwarna merah pada pH 4.4 dan berwarna kuning dalam lingkungan dengan pH 6.2.

Bakteri yang memfermentasi glukosa pada medium MR-VP akan menghasilkan produk akhir berupa asam campuran seperti asam laktat, suksimat, format, dan bercampur dengan CO_2, H_2 dan etanol. Akumulasi dari asam-asam ini dapat menurunkan pH menjadi 5 atau kurang, maka jika ditambahkan reagen *Methyl Red* pada medium biakan akan berwarna merah, yang menandakan bahwa mikroorganisme tersebut merupakan penghasil asam campuran.

7. Uji VP (Voges-Proskeuer)

Uji VP menggunakan media MRVP yakni media yang mengandung pepton glukosa phospat. Uji VP dilakukan untuk mengetahui pembentukan asetil metil karbinol (asetoin) dari hasil fermentasi gula. Hasil negatif ditandai dengan tidak berubahnya warna media menjadi merah setelah ditambahkan α-naftol 5% dan KOH 40%. Sedangkan hasil positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna media menjadi merah setelah ditambahkan α-naftol 5% dan KOH 40%, hal ini menunjukkan bahwa hasil akhir dari fermentasi bakteri adalah asetil metil karbinol (asetoin) (MacFaddin, 1980).

8. Uji Urease

Uji urease digunakan untuk melihat bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease. Beberapa mikroorganisme mampu

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

menghasilkan enzim urease yang mampu menguraikan mikromolekul urea ($(NH_2)_2CO$) menjadi karbondioksida (CO_2) dan ammonia (NH_3). Ammonia yang dihasilkan akan meningkatkam pH media yang menjadi bersifat basa dengan perubahan media berwarna orange menjadi berwarna *deep pink.*

9. Uji Lysin Iron Agar (LIA)

Uji LIA dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memproduksi Lysine Dikarboxylase dapat diketahui dan juga produksi H_2S. *Lysin Iron Agar* adalah agar semi solid yang mengandung dekstrose dan L-lysine sebagai unsur utama serta brom cresol purple sebagai indikator. Jika bakteri hanya memfermentasi dekstros maka dasarnya akan berwarna kuning, tetapi bakteri yang memfermentasi dekstros serta mendekarboksilase L-lysine, maka pH kembali menjadi alkali sehingga akan terlihat medium secara keseluruhan berwarna ungu dengan adanya indikator *brom crose purple.* Uji LIA dilakukan dengan mengambil satu ose biakan bakteril, kemudian dimasukan ke dalam dasar tabung agar dan dioleskan ke seluruh permukaanya kemudia diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Terjadinya warna ungu pada seluruh bagian berarti tes positif. Jika tidak ada

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

perubahan warna atau dasarnya berwarna kuning maka tes dinyatakan negatif (Buller, 2004).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang meliputi isolasi dan identifikasi bakteri ureolitik serta uji kemampuan presipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) dari Gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel akan dilakukan di Gua Kembar kawasan karst yang berada di desa Kedungsalam kecamatan Donomulyo Kabupaten Malang, Jawa Timur. Penelitian dilakukan pada bulan Januari-bulan Desember 2019. Pemilihan gua didasarkan pada tipe gua, banyaknya ornamen dalam gua, kemudahan untuk dijangkau serta belum adanya penelitian terkait bakteri pembentuk kalsium karbonat ($CaCO_3$) di gua tersebut. Analisis dan identifikasi sampel dilakukan di Laboratorium Terintegrasi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya. Jadwal penelitian ini dapat dilihat dalam Tabel 3.1.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 3.1 Jadwal Penelitian

No.	Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	Preparasi alat bahan di lapangan												
2.	Pengambilan sample di lapangan												
3.	Preparasi alat bahan dilaboratorium												
4	Isolasi dan purifikasi sampel tanah dari lapangan												
5.	Pengamatan makroskopis isolat murni												
6.	Uji aktiviitas enzim urease												
7.	Uji presipitasi $CaCO_3$												
8.	Identifikasi mikroskopis (pewarnaan gram dan uji fisiologis)												
9.	Analisis data dan pembahasan												

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat-Alat yaang digunakan

Beberapa alat yang digunakan saat pengambilan sampel di gua yaitu *cool box*, skop kecil, botol urin, tisu dan alkohol 70%. Alat-alat untuk analisis di laboratorium adalah autoklaf, *laminar air flow* (LAF), oven, inkubator, spektrofotometer, *shaker water bath*, neraca analitik, *kompor*, botol *schott* 25 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur 100 ml, pipet volume 10 ml, spatula, pengaduk, kaca, jarum ose, mikropipet 1000 µL, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml, tabung durham,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

corong, alumunium voil, *plastic wrap*, bunsen, tip 1000 µL, *beaker glass* 500 ml, batang *spreader*, *vortex*, objek glas, kapas, spidol F, kertas label.

3.3.2 Bahan-bahan yang digunakan

Sampel tanah dari kawasan karst Gua Kembar Malang, urea, $NaHCO_3$, NH_4Cl, media *Nutrient Broth* (NB), $CaCl_2.H_2O$, agar, aquades, NaOH 2M, media urea agar, NaCl fisiologi 0,85%, kertas pH, kristal violet, lugol, safranin, alkohol 70%, gula *sucrose*, glukosa, laktosa, indikator *phenol red*, media *cimmon citrate*, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *Motilitas Indol Ornithin* (MIO), reagen *kovacs*, media *Methyl Red Voges-Proskauer* (MRVP), *methyl red*, KOH 40%, alfa naftol 5%, H_2O_2 3%, dan kertas saring.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi sampel serta alat dan bahan

a. Pengambilan sampel tanah dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur.

Pengambilan sampel di gua Kembar dari kawasan karst Malang, Jawa Timur dilakukan di tiga zona pada gua yaitu pada zona terang, zona remang, dan zona gelap total dengan masing-masing zona diambil sampel pada lantai gua dan dinding gua, sampel yang didapatkan berjumlah enam. Pengambilan sampel dilakukan secara random dan dimasukkan ke dalam botol urin yang disterilkan menggunakan alkohol 70%. Kemudian diberi identitas sampel yang berisi tempat atau lokasi pengambilan sampel (kota), tanggal, lantai gua atau dinding gua, dan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

zona-zona yang ada digua dan disimpan didalam *coolbox* yang berisi *gel ice* untuk dianalisis di dalam laboratorium.

b. Sterilisasi alat dan media

Alat-alat yang diperlukan dicuci bersih kemudian dikering anginkan. Kemudian dibungkus dengan kertas dan dimasukkan di dalam plastik tahan panas, sedangkan untuk media yang sudah dibuat di tutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian alat-alat dan media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121^0C pada tekanan 1 atm selama 15 menit untuk media dan 20 menit untuk alat.

c. Sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF)

Ruang kerja untuk inokulasi bakeri di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) harus disterilisasi terlebih dahulu agar tidak terjadi kontaminasi saat inokulasi. LAF disemprot dengan alkohol 70% untuk dibersihkan, kemudian alat dan media yang sudah disterilisasi di masukkan ke dalam LAF lalu disterilisasi secara radiasi menggunakan lampu UV selama 20-30 menit.

3.4.2 Pembuatan media

a. Pembuatan NaCl Fisiologis 0,85%

Pembuatan garam Fisiologis 0,85% dibutuhkan 1000 ml aquades steril dan 8,5 gram NaCl.

b. Pembuatan stok urea steril

Urea sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 5 ml aquades steril, kemudian dihomogenkan dan disterilisasi menggunakan *steryl syringe* Whatmann 0,45 µm secara aseptis di dalam botol *schott* steril

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

c. Pembuatan media *Calcium Carbonate Precipitation* (CCP)

Pembuatan media *Calcium Carbonate Precipitation* (CCP) dalam komposisi 1000 ml dibutuhkan sebanyak 20 gram urea, 2,12 gram $NaHCO_3$, 10 gram NH_4Cl, 3 gram *Nutrient Broth*, 30 mM $CaCl_2$, 20gram agar, pH diatur 8,5 dengan NaOh 2M. Media CCP 1000 ml tanpa urea disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121^0C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah media CCP disterilissai ditambahkan urea steril 20 ml secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), karena sifat urea yang mudah rusak pada titik didih tinggi maka penambahan urea dilakukan setelah media CCP disterilisasi dalam autoklaf, urea disterilisasi menggunakan syringe sterile whatmann 0,45µL (Weit *et al*., 2015).

d. Pembuatan media urea agar

Komposisi per 100 ml mengandung 0,9 gram urea *basebroth* dan 5 ml urea 40% (Hammes *et al*, 2003).

e. Pembuatan media NB-U/Ca

Komposisi pembuatan media NB-U/Ca dalam 1000 ml aquades adalah 3 gram *nutrient broth*, 20 gram urea, dan 28,5 gram $CaCl_2.H_2O$ (Krishnapriya *et al*, 2015).

3.4.3 Isolasi dan purifikasi bakteri ureolitik

Isolasi bakteri dari sampel tanah dari gua Kembar di kawasan karst Malang, Jawa Timur. Sampel tanah ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl Fisiologis 0,85%, dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian dibuat pengenceran bertingkat hingga

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

10^{-4}, diambil 100 µL dari pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} mLdibuat dua ulangan (*duplo*) dan diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi media selektif CCP dengan metode *spread plate* kemudian di inkubasi selama 7 hari dalam suhu ruangan 25^0C. Selanjtnya isolat dimurnikan menggunakan metode 16 goresan hingga didapatkan isolat yang seragam.

3.4.4 Uji aktivitas enzim urease

Isolat yang telah terpilih selanjutnya diuji aktivitas ureasenya dalam media urea agar. Isolat diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media urea agar. Kemudian diinkubasi selama 1-2 hari dalam suhu ruangan. Jika terjadi perubahan dari media urea agar yang berwarna orange menjadi berwarna merah muda atau *deep pink* maka isolat yang dipilih tersebut mampu menghidrolisis enzim urease (Hammes *et al*, 2003).

3.4.5 Uji presipitasi $CaCO_3$ isolat bakteri ureolitik pada media NB-U/Ca

Isolat-isolat bakteri yang telah diperoleh, kemudian dibuat inokulum dengan total populasi 10^8 CFU/ml. Suspensi bakteri dibuat dengan menambahkan beberapa ose bakteri pada erlemeyer berukuran 250 ml yang berisi 30 ml NaCl fisiologis 0,85%, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex, suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung kuvet beberapa ml untuk diukur absorbansinya pada spektrofotometer. Pembuatan inokulum 10^8 CFU/ml ini menggunakan standar Mc. Farland 0,5 (setara dengan ± 10^8 CFU/mL, λ65 nm= 0,08-0,1 untuk bakteri dan $1x10^6$ – $5x10^6$ CFU/mL, λ600 nm= 0,08-0,1 untuk

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

fungi) (Bailey dan Scott, 1994). Penambahan isolat bakteri atau NaCl fisiologis ditambahkan teus-menerus hingga absorbansinya mencapai 0,1.

Inokulum 10^6 CFU/ml dibuat dua ulangan, dari masing-masing isolat diambil 0,6 ml kemudian diinokulasikan kedalam 30 ml media NB-U/Ca dan diinkubasi selama 7 hari di atas shaker pada kecepatan 130 rpm dengan suhu 30^0C. Hasil dari presipitasi dari masing-masing isolat disaring menggunakan kertas saring (Whatman No. 42) kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 60^0C selama 3 jam lalu ditimbang. Perhitungan berat presipitat ($CaCO_3$) yang dihasilkan menggunakan rumus yang dijelaskan oleh Krishnapriya *et al*. (2015) sebagai berikut :

$$Wc : Wfc - Wf$$

Keterangan :

Wc : Berat presipitat $CaCO_3$

Wfc : Berat kertas saring dan presipitat $CaCO_3$

Wf : Berat kertas saring

3.4.6 Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri yang dilakukan mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinatinative Bacteria*. Beberapa identifikasi yang dilakukan yaitu secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

a. Identifikasi bakteri secara makroskopis

Identifikasi makroskopis bakteri berdasarkan *form* (bentuk koloni), *margin* (tepi), dan elevasi (Prescott *et al*., 2005).

1) *Form* (bentuk koloni)

Bentuk koloni bakteri bermacam-macam ada yang berbentuk sirkuler (bulat, bertepi), *irreguler* (tidak beraturan, bertepi), dan rhizoid (bentuk seperti akar, pertumbuhan menyebar).

2) *Margin* (tepi koloni)

Koloni bakteri memiliki tipe margin yang berbeda-beda seperti *entire* (tepian rata), *lobate* (tepian berlekuk), *undulate* (tepian bergelombang), *serrate* (tepian bergerigi), dan *filamentous* (tepian seperti benang-benang).

3) Elevasi

Pengukuran elevasi pada koloni diperlukan untuk mengetahui ketinggian pertumbuhan koloni bakteri. Beberapa diantaranya elevasi pada koloni bakteri yaitu *flat* (ketinggian tidak teratur, jika dilihat hampir rata dengan medium), *raised* (ketinggian benar-benar terlihat, namun rata pada seluruh permukaan), *convex* (bentuk cembung seperti tetesan air), dan *umbonate* (bentuk cembung dan pada bagian tengah terlihat lebih cembung).

b. Identifikasi bakteri secara mikroskopis

Gelas objek dibersihkan menggunakan alkohol 70% kemudian diberi label isolat bakteri yang akan diamati, selanjutnya diteteskan aquades dan isolat diambil secara aseptis lalu diratakan diatas gelas

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

objek, difiksasi diatas bunsen hingga isolat menempel. Kemudian diteteskan cat Gram A (kristal violet) 2-3 tetes, diratakan selama 1 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi Gram B (lugol atau iodine) selama 1 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjynya proses dekolorisasi ditetesi dengan Gram C (alkohol 96%) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir ditetesi dengan Gram D (safranin) selama 45 detik, dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan. Selanjutnya dilakukan pengamatan dibawah mikroskop, bakteri gram negatif akan terlihat berwarna pink sedangkan gram positif berwarna ungu serta pengamatan bentuk bakteri yang berbeda-beda (Bailey and Scott, 1994).

c. Uji Aktivitas Biokimia

Aktivitas biokimia dalam bakteri merupakan suatu metabolisme dari berbagai reaksi kima yang berlangsung dalam tubuh bakteri untuk mempertahankan hidup.

1) Uji Fermentasi gula

Uji fermentasi gula menggunakan tiga macam gula yaitu sukrosa, laktosa dan glukosa dengan komposisi masing-masing 1 gram dalam 100 ml aquades, *peptone water* 1 gram dan sedikit *phenol red* hingga media berwarna merah. Setelah media disterilisasi disimpan di dalam kulkas pada suhu 3^0C selama 24 jam. Isolat murni bakteri sebanyak satu ose diinokulasikan ke dalam media gula sebanyak 6 ml dengan tabung durham di

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dalamnya yang diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37^0C. Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna media menjadi kuning dan terdapat gelembung di dlam tabung durham (Adam, 2001).

2) Uji MIO (Motilitas Indol Ornithin)

Uji motilitas pada isolat bakteri diujikan pada media MIO dengan komposisi 31 g dalam 100 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 ml. Media MIO yang telah disterilisasi disimpan dalam kulkas pada suhu 3^0C selama 24 jam. Isolat murni diambil sebanyak satu ose dan ditusukkan pada media semi solid, lalu diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam. Isolat bakteri yang motil media berubah jadi keruh. Ornithin dekarboxylase positif berwarna ungu/biru pada daerah anaerobnya sedangkan jika negatif berwarna kuning. Indol positif jika terbentuk cincin merah saat ditetesi reagen kovaks pada media (Shields dan Cathcart, 2011).

3) Uji katalase

Pengujian katalase diambil biakan isolat murni bakteri menggunakan ose kemudian disuspensikan kedalam setetes H_2O_2 3% diatas *object glass.* Jika terbentuk gelembung maka isolat positif pada uji katalase (Bisen, 2004).

4) Uji H_2S (Media TSIA)

Uji H_2S dilakukan menggunakan media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) dengan komposisi 1,5 gram dalam 100 ml. Media disterilissai lalu disimpan pada suhu 3^0C selama 24 jam. Isolat

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

murni bakteri diambil sebanyak satu ose lalu ditusukkan dan digoreskan pada media miring TSIA, lalu diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam. Isolat positif ditandai dengan terbentuknya warna hitam pada media (Salle, 1961).

5) Uji Penggunaan Sitrat (media *simon citrate agar*)

Uji sitrat menggunakan media *simon citrate agar* (SCA) sebanyak 1,5 gram dalam 50 ml aquades dan setelah disterilissai disimpan pada suhu 3^0C. Diambil isolat murni sebanyak satu ose dan digoreskan pada media miring SCA dan diinkubasi pada suhu 37^0C selama 1x24 jam. Isolat positif ditandai dengan media yang berwarna hijau menjadi biru (Lay, 1994).

6) Uji *Methyl Red* (MR)

Uji MR menggunakan media MRVP sebanyak 2,5 gram dalam 50 ml aquades. Media disterilissai lalu disimpan pada suhu 3^0C selama 24 jam. Isolat murni sebanyak satu ose dimasukkan ke dalam media MR dan diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan *methyl red*, isolat yang positif berwarna merah pada media MR (MacFaddin, 1980).

7) Uji *Voges-Proskauer* (VP)

Uji VP menggunakan media MRVP sebanyak 2,5 gram dalam 50 ml aquades. Media disterilissai lalu disimpan pada suhu 3^0C selama 24 jam. Isolat murni sebanyak satu ose dimasukkan ke dalam media MR dan diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan KOH 40% dan alfa naftol, kemudian

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dihomogenkan menggunakan *vortex*. Isolat positif ditandai dengan warna merah dan kuning atau tidak berwarna pada isolat yang negatif (MacFaddin, 1980).

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa hasil uji kualitatif aktivitas enzim urease dan data kuantitatif uji presipitasi $CaCO_3$ oleh bakteri yang dianalisis secara statistik deskriptif menggunakan *Microsoft Excel* 2013. Hasil identifikasi bakteri dianalisis secara deskriptif berdasarkan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteria* 2nd edition (Noel *et al*., 1989), Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria (3rd Ed.) (Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham, 1993) dan Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology Fourtheen Edition (Tille, 2017).

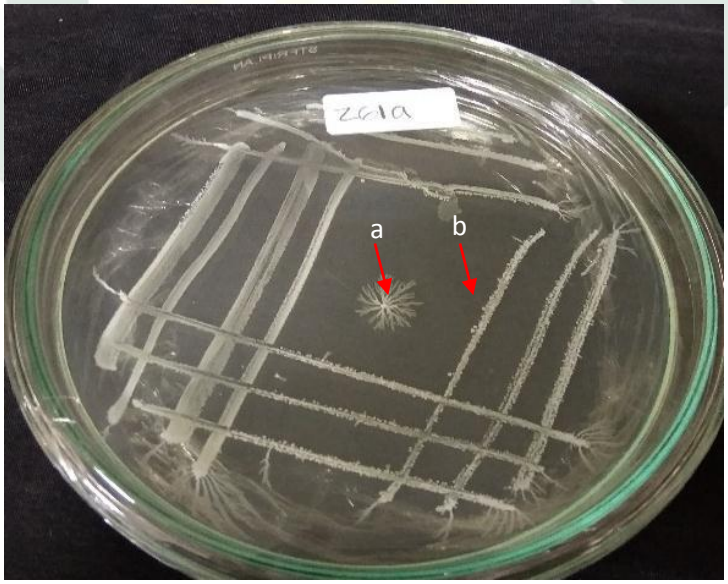
digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Ureolitik

Isolasi dan purifikasi bakteri tanah pada media selektif *Calcium Carbonate Precipitation (CCP)* yang didapatkan dari sampel tanah di kawasan karst Gua Kembar di Desa Kedungsalam Kecamatan Donomulyo Kabupaten Malang pada lantai dan dinding gua pada zona gelap, zona remang dan zona terang didapatkan 10 isolat dengan karakteristik yang berbeda-beda dari bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, dan elevasi koloni (Gambar 4.1).



Gambar 4.1. Purifikasi Isolat ZG1a dengan Metode 16 Goresan,
(a) koloni tunggal (b) beberapa koloni
Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2019

Adapun beberapa isolat yang telah didapatkan dari proses isolasi hingga purifikasi diberikan kode berdasarkan lokasi pengambilan dan kode bakteri saat dimurnikan yang disajikan dalam tabel 4.1 sebagai berikut :

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.1 Lokasi pengambilan sampel dan Kode Isolat bakteri ureolitik Gua Kembar

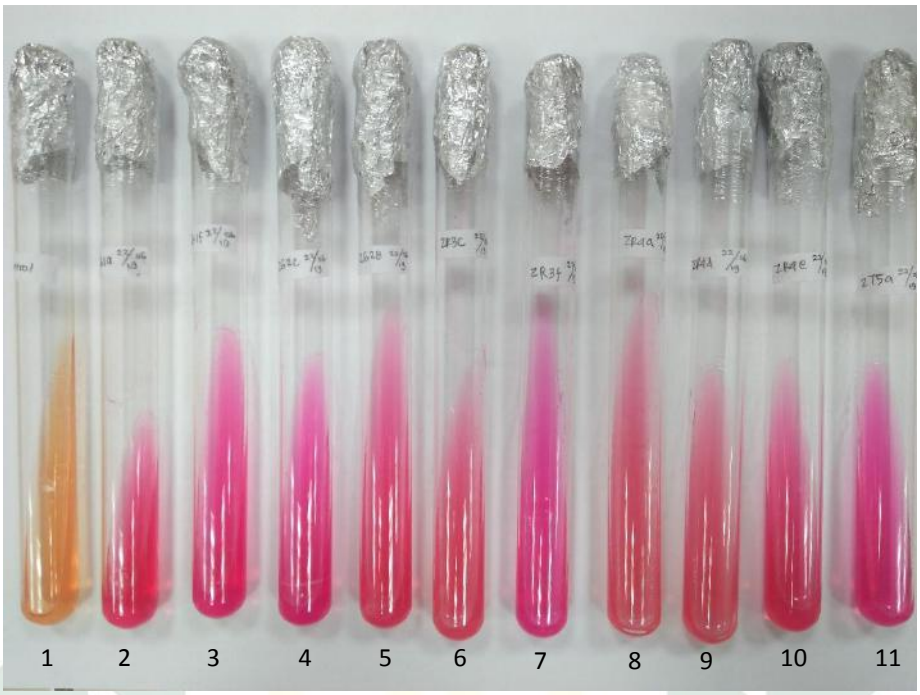
No.	Kode Isolat	Lokasi Pengambilan
1	ZG1a	Zona Gelap Lantai Gua bakteri a
2	ZG1f	Zona Gelap Lantai Gua bakteri b
3	ZG2c	Zona Gelap Dinding Gua bakteri c
4	ZG2d	Zona Gelap Dinding Gua bakteri d
5	ZR3c	Zona Remang Lantai Gua bakteri c
6	ZR3f	Zona Remang Lantai Gua bakteri f
7	ZR4a	Zona Remang Dinding Gua bakteri a
8	ZR4d	Zona Remang Dinding Gua bakteri d
9	ZR4e	Zona Remang Dinding Gua bakteri e
10	ZT5a	Zona Terang Lantai Gua bakteri a

Keterangan : kode isolat ganjil adalah lokasi pengambilan bakteri dari lantai gua. Sedangkan kode isolat genap adalahn lokais pengambilan bakteri dari dinding gua.

4.1.2 Uji Kualitatif Aktivitas Enzim Urease

Isolat bakteri yang berpotensi memiliki kemampuan presipitasi kalsium karbonat yang telah diisolasi pada media selektif *Calcium Carbonate Precipitation* (CCP), selanjutnya diuji kemampuannya dalam menghidrolisis urea menggunakan enzim urease yang ada padanya melalui media urea agar. Hasil positif ditunjukkan dengan berubahnya media urea agar yang berwarna orange menjadi *deep pink* atau *pink* magenta (gambar 4.2).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.2. Hasil pengamatan isolat bakteri ureolitik pada uji aktivitas enzim urease dari kiri ke kanan (1. Kontrol, 2. ZG1a, 3. ZG1f, 4. ZG2c, 5. ZG2d, 6. ZR3c, 7. ZR3f, 9. ZR4a, 9. ZR4d, 10. ZR4e, 11. ZT5a)

Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2019

Hasil pengamatan uji aktivitas enzim urease berdasarkan kemampuan isolat dalam menghidrolisis urea yang ditunjukkan dengan perubahan warna media urea agar memiliki kurun waktu yang berbeda-beda. Isolat yang memiliki perubahan warna pada media urea agar dalam waktu 24 jam termasuk dalam bakteri yang memiliki kemampuan *fast activity*, sedangkan isolat bakteri yang mampu menghidrolisis urea setelah lebih dari 24 jam tergolong dalam bakteri yang memiliki kemampuan *slow activity*. Hasil pengamatan yang diperoleh disajikan dalam tabel 4.2.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.2 Hasil pengamatan uji aktivitas enzim urease

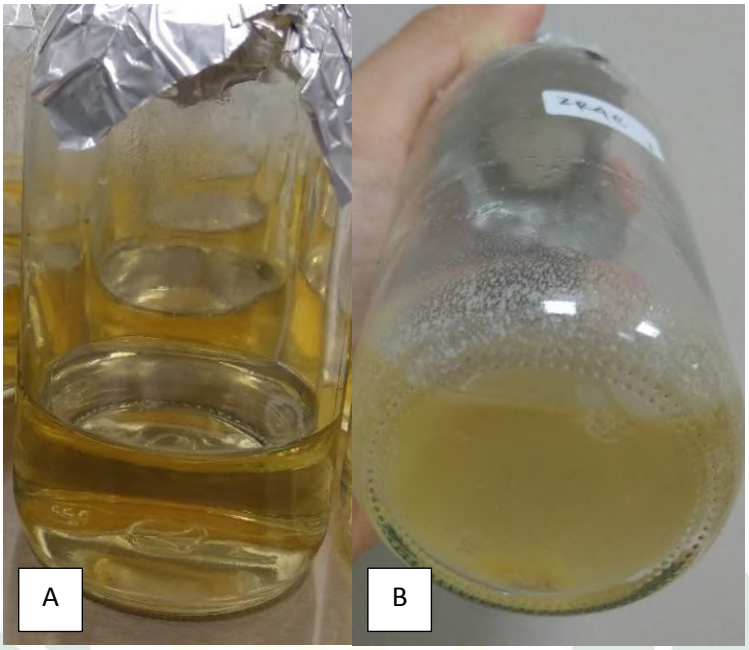
No.	Kode Isolat	Uji Enzim Urease	Kemampuan Hidrolisis Urea
1	ZG1a	*Pink samar*	(+)
2	ZG1f	*Pink* kuat	(++)
3	ZG2c	*Pink* kuat	(++)
4	ZG2d	*Pink* samar	(+)
5	ZR3c	*Pink* samar	(+)
6	ZR3f	*Pink* kuat	(++)
7	ZR4a	*Pink* samar	(+)
8	ZR4d	*Pink* samar	(+)
9	ZR4e	*Pink* samar	(+)
10	ZT5a	*Pink* kuat	(++)

Keterangan : + = *slow activity* atau kemampuan hidrolisis lambat lebih dari 24 jam
++ = *fast activity* atau kemampuan hidrolisis cepat kurang atau dalam waktu 24 jam

4.1.4 Uji Kemampuan Presipitasi *Calcium Carbonate* ($CaCO_3$)

Isolat bakteri Ureolitik yang diuji kemampuannya dalam mempresipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) pada media NB-U/Ca dengan masa inkubasi yang dilakukan di dalam shaker selama 7 hari dengan suhu 30^0C dengan kecepatan 130 rpm. Masing-masing isolat bakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam presipitasi kalsium karbonat yang dilihat dari berat presipitat kalsium karbonat yang ditimbang beratnya dalam satuan gram, endapan presipitat kalsium karbonat berwarna putih berada pada permukaan botol (Gambar 4.3).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

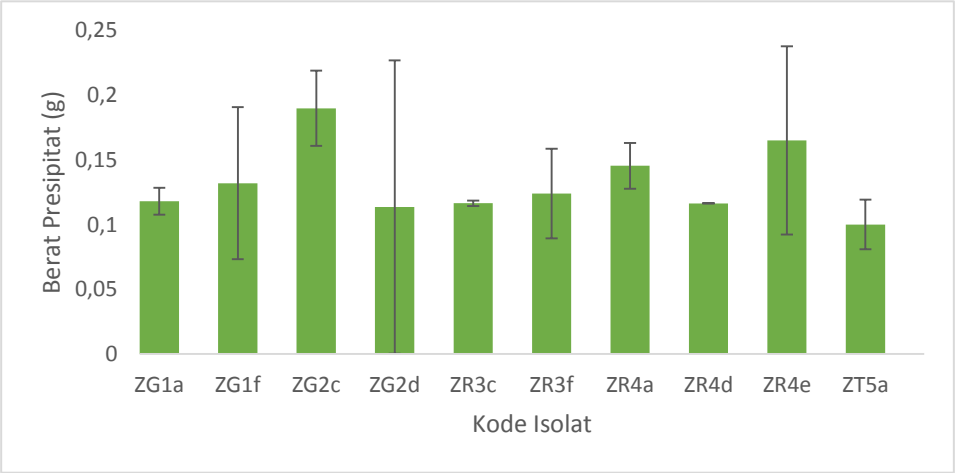


Gambar 4.3 Uji presipitasi kalsium karbonat pada medium NB-U/Ca selama 7 hari pada suhu 30^0C kecepatan 130 rpm: (A) tanpa diinokulasikan bakteri, (B) diinokulasikan isolat ZR4e

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019

Setiap isolat bakteri memiliki kemampuan presipitasi yang berbeda-beda, hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.4 untuk mengetahui perbedaan presipitat yang dihasilkan masing-masing isolat. Hasil presipitat paling tinggi dihasilkan oleh isolat ZG2c sebanyak 0,18985±0,02906 gram dan berat presipitat paling sedikit dihasilkan oleh isolat ZT5a sebanyak 0,10005±0,019163 gram. digambarkan dalam bentuk grafik (Gambar 4.4).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id



Gambar 4.4. Berat Presipitat Kalsium Karbonat ($CaCO_3$) Isolat Bakteri Ureolitik dengan Masa Inkubasi Tujuh Hari pada Suhu 30^0C Kecepatan 130 rpm

4.1.3 Identifikasi Genus Isolat Bakteri Ureolitik

Identifikasi bakteri ureolitik dari gua Kembar, Malang diidentifikasi berdasarkan bentuk makroskopis, mikroskopis, dan sifat biokimianya.

a. Pengamatan Morfologi secara Makroskopik

Sepuluh isolat bakteri yang didapatkan diamati morfologi koloni bakteri berdasarkan bentuk (*form*), tepi (*margin*), elevasi, dan warna koloni. Hasil pengamatan disajikan dalam tabel 4.4.

Tabel 4.3 Hasil Pengamatan Makroskopik Isolat Bakteri Ureolitik

No.	Kode Isolat	*Form*	Margin	Elevasi	Warna Koloni
1	ZG1a	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Raised*	Putih Susu
2	ZG1f	*Circular*	*Entire*	*Convex*	Putih Susu
3	ZG2c	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Raised*	Putih Susu
4	ZG2d	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Convex*	Putih Susu
5	ZR3c	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Raised*	Putih Susu
6	ZR3f	*Irregular*	*Undulate*	*Convex*	Putih Susu
7	ZR4a	*Filamentous*	*Filamentous*	*Raised*	Putih Susu
8	ZR4d	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Raised*	Putih Susu
9	ZR4e	*Rhizoid*	*Rhizoid*	*Raised*	Putih Susu

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

10	ZT5a	*Circular*	*Entire*	*Convex*	Putih Susu

b. Pengamatan secara Mikroskopik

Dari hasil pewarnaan gram pada isolat bakteri ureolitik didapatkan bakteri gram negatif dan gram positif dengan bentuk sel coccobacillus, coccus, dan bacil. Hasil pewarnaan gram dan pengamatan bentuk sel disajikan dalam tabel 4.5.

Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Mikroskopik Isolat Bakteri Ureolitik

No.	**Kode Isolat**	**Sifat Gram**	**Bentuk Sel**
1	ZG1a	Positif	*Coccobacillus*
2	ZG1f	Negatif	*Coccus*
3	ZG2c	Positif	*Coccobacillus*
4	ZG2d	Positif	*Coccobacillus*
5	ZR3c	Positif	*Coccobacillus*
6	ZR3f	Negatif	*Bacillus*
7	ZR4a	Positif	*Coccobacillus*
8	ZR4d	Positif	*Coccobacillus*
9	ZR4e	Positif	*Coccobacillus*
10	ZT5a	Negatif	*Bacillus*

c. Uji Aktivitas Biokimia

Hasil uji aktivitas biokimia pada isolat bakteri ureolitik dari tanah gua Kembar disajikan dalam bentuk tabel. Identifikasi isolat bakteri ureolitik dari Gua Kembar melalui beberapa metode identifikasi bakteri berdasarkan panduan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* didapatkan beberapa genus bakteri, setiap genus memiliki karakteristik yang berbeda-beda, dari hasil pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia yang akan disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut :

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.5 Identifikasi Genus Isolat ZG1a, ZG2c, ZG2d, dan ZR4d

Isolat	**Gram**	***Shape***	**Katalase**	**Laktosa**	**Glukosa**	**Sukrosa**	**VP**	**Indole**
ZG1a	+	Rod	+	-	-	-	+	-
ZG2c	+	Rod	+	-	-	-	+	-
ZG2d	+	Rod	+	-	-	-	+	-
ZR4d	+	Rod	+	-	-	-	+	-
Bacillus	+	Rod	+	-	-	-	+	-

Isolat bakteri ZG1a, ZG2c, ZG2d, dan ZR4d dari hasil identifikasi masuk dalam genus *Bacillus,* namun memiliki perbedaan dalam beberapa uji biokimia dalam hal ini perlu untuk dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui lebih spesifik spesies dari masing-masing isolat.

Tabel 4.6 Identifikasi Genus Isolat ZR3c

Isolat	**Gram**	***Shape***	**Katalase**	**Laktosa**	**Glukosa**	**Sukrosa**	**VP**	**Indole**
ZR3c	+	Rod	+	-	-	-	-	-
Solibacillus	+	Rod	+	-	-	-	-	-

Isolat bakteri ZR3c dari hasil identifikasi memiliki kemiripan karakteristik bakteri yang mendekati pada genus *Solibacillus.*

Tabel 4.7 Identifikasi genus Isolat ZR3f

Isolat	**gram**	***Shape***	**MR**	**VP**	**Sitrat**	**H_2S**	**Urea**	**Motil**	**Indole**	**Katalase**	**Gas glukosa**	**Laktosa**	**Sukrosa**
ZR3f	-	Rods	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Yersinia	-	Rods	+	-	-	-	+	-	V	+	-	-	-

Keterangan : V = reaksi bakteri 90% positif atau 90% negatif tergantung spesiesnya

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Isolat ZR3f dari hasil identifikasi memiliki kemiripan yang mendekati genus bakteri *Yersinia*. Namun memiliki perbedaan pada uji MR yang pada genus bakteri *Yersinia* seharusnya positif sedangkan pada uji *indole* memiliki keterangan V yakni pada beberapa spesies ada yang positif atau ada yang negatif.

Tabel 4.8 Identifikasi Genus Isolat ZR4a

Isolat	**gram**	***Shape***	**Katalase**	**Laktosa**	**Glukosa**	**Sukrosa**	**Urea**	**Motil**	**Indole**	**Ornithin**	**VP**	**Sitrat**
ZR4a	+	Rods	+	-	+	+	+	+	-	-	W	-
Paenibacillus validus	+	Rods	+	-	+	+	+	+	-	-	W	-

Keterangan : W = *Weak*, positif namun lemah

Tabel 4.9 Identifikasi Genus Isolat ZR4e

Isolat	**gram**	***Shape***	**Katalase**	**Laktosa**	**Glukosa**	**Sukrosa**	**Urea**	**Motil**	**Indole**	**Ornithin**	**VP**	**Sitrat**
ZR4e	+	Rods	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Paenibacillus septentrionalis	+	Rods	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-

Isolat ZR4a pada Tabel 4.8 dari hasil identifikasi genus bakteri memiliki karakteristik yang mendekati genus *Paenibacillus*, sedangkan isolat ZR4e pada Tabel 4.9 memiliki karakteristik yang mendekati pada genus *Paenibacillus* juga. Namun pada isolat ZR4e memiliki karakteristik yang mendekati pada spesies *Paenibacillus validus* dan isolat ZR4e mendekati karakteristik isolat bakteri *Paenibacillus septentrionalis*.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Tabel 4.10 Identifikasi genus isolat ZT5a

Isolat	Gram	*Shape*	Katalase	Motilitas	Urease	H_2S	VP	Indol
ZT5a	-	Rods	+	-	+	-	+	-
Klebsiella	-	Rods	+	-	+	-	+	-

Tabel 4.11 Identifikasi genus isolat ZG1f

Isolat	Gram	*Shape*	Katalase	Ornithin	Sitrat	MR	VP	Urease
ZG1f	-	Coccus	+	+	-	-	+	+
Neisseria	-	Coccus	+	+	-	-	+	+

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi dan Purifikasi Bakteri Ureolitik

Bakteri dari sampel tanah dari gua Kembar yang berada di kawasan karst Desa Kedungsalam Kecamatan Donomulyo Kabupaten Malang, diisolasi dan dimurnikan menggunakan media selektif *Calcium Carbonate Precipitation* (CCP) agar. Isolat bakteri yang tumbuh diindikasikan merupakan bakteri ureolitik yang mampu membentuk kalsium karbonat ($CaCO_3$) karena bakteri mampu tumbuh di media selektif CCP, media CCP ini mengandung urea dan $CaCl_2$ yang dibutuhkan bakteri ureolitik dalam hidrolisis urea untuk memproduksi karbonat dan ammonia (Wei *et al.*, 2014).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Hasil penelitian ini didapatkan sepuluh isolat bakteri yang berhasil diisolasi menggunakan media selektif CCP dengan kode sesuai dengan lokasi pengambilan. Bakteri berasal dari zona gelap (ZG) yaitu ZG1a, ZG1f, ZG2c, ZG2d, dan ZG2c. Bakteri dari zona remang (ZR) yaitu ZR3f, ZR4a, ZR4d, dan ZR4e. Bakteri dari zona terang (ZT) yaitu ZT5a. Seluruh isolat dimurnikan pada media CCP baru dengan metode 16 goresan (Gambar 4.1) dengan tujuan bisa didapatkan kultur yang murni, metode ini dapat mempermudah proses pemurnian karena memiliki prinsip kerja goresan bertingkat. Isolat dimurnikan hingga seluruh koloni telah seragam.

Beberapa penelitian pada isolasi bakteri ureolitik menggunakan media selektif *calcium carbonate precipitation* (CCP) untuk mendapatkan isolat bakteri ureolitik. Penelitian yang dilakukan oleh Wei *et al*.(2015), pada sedimen laut yang juga diisolasi pada media CCP didapatkan tiga isolat bakteri ureolitik. Penelitian Rukmana dan Zulaika (2017), yang dilakukan di tiga tempat yaitu pegunungan Suci, bukit Jaddih dan gua Akbar didapatkan 15 isolat bakteri ureolitik yang berhasil diisolasi menggunakan media CCP.

4.2.2 Uji Kualitatif Adanya Aktivitas Enzim Uresae

Enzim urease disebut juga sebagai urea amidohidrolases yang memiliki peran dalam mengkatalis hidrolisis dari urea menjadi ammonia dan karbonat. Urease merupakan enzim yang umum ditemukan dalam bakteri, kapang, dan beberapa tanaman tingkat tinggi (Sujoy dan Aparna, 2013). Enzim urease merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis dari urea menjadi ammonia dan karbonat. Enzim ini menggunakan urea sebagai

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

substrat yang akan dihidrolisis menjadi amonia dan asam karbonat sebagai produk akhir. Urease berperan dalam memudahkan organisme menggunakan urea sebagai sumber nitrogen dan energi (Krajewska, 2009).

Uji kualitatif enzim urease yang dilakukan pada 10 isolat bakteri dari gua Kembar yang telah terseleksi ditumbuhkan pada media urea agar dengan indikator *phenol red*, isolat bakteri yang positif atau mampu menghasilkan enzim urease ditandai dengan perubahan warna media urea agar dari oren menjadi berwarna *pink* atau *deep pink*. Adanya perubahan warna media disebabkan oleh medium yang berisi *phenol red* sebagai indikator perubahan pH. Kesepuluh isolat bakteri yang telah diujikan mampu menghasilkan enzim urease.

Beberapa penelitian uji kualitatif enzim urease menggunakan media urea agar untuk mengetahui bakteri penghasil enzim urease telah dilakukan. Pada penelitian Febria dkk. (2015), di gua Baba Sumatera didapatkan 10 isolat bakteri dari *flowstone* yang positif menghasilkan enzim urease. Penelitian Zulaika dan Rukmana (2017), uji kualitatif enzim urease pada isolat bakteri dari pegunungan Suci Gresik, Bukit Jaddih Madura dan Gua Akbar Tuban terdapat 15 isolat yang terseleksi. Dari 15 isolat, terseleksi 8 isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim urease yaitu SG 2, SG 3, SG 4, SG 5, JB 2, JB 3, AT 2 dan AT 3.

Isolat bakteri memiliki kemampuan yang berbeda-beda pada uji aktivitas enzim urease, ada yang *slow activity* atau proses pembentukannya lambat lebih dari 24 jam dan *fast activity* dengan proses hidrolisis urea yang cepat dengan waktu kurang lebih 4 sampai 24 jam yang ditunjukkan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.1., Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri yang telah didapat diindikasikan mampu mempresipitasi $CaCO_3$, dengan adanya ion karbonat yang dihasilkan tersebut akan mempresipitasi $CaCO_3$ ketika terdapat sumber kalsisum. Adanya enzim urease diperlukan bakteri untuk menghidrolisis urea menjadi ammonia dan CO_2, meningkatkan pH dan konsentrasi karbonat di lingkungan bakteri (Bharathi, 2012).

4.2.3 Uji Kemampuan Presipitasi *Calcium Carbonate* ($CaCO_3$)

Dari sepuluh isolat murni yang telah diuji secara kualitatif dalam menghasilkan enzim urease menunjukkan hasil positif yang merupakan acuan untuk mengetahui bakteri yang mampu mempresipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) yang selanjutnya diujikan dalam media cair NB-U/Ca untuk mengetahui kemampuan presipitasi isolat bakteri. Karbonat merupakan hasil dari hidrolisis urea oleh enzim urease yang terdapat dalam bakteri, yang dikatalisis oleh enzim urease, bakteri tersebut adalah bakteri yang terlibat dalam siklus nitrogen melalui asam amino atau hidrolisis urea, bakteri ini menggunakan asam amino sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi dimana bakteri tanah termasuk di dalamnya (Dhami *et al*., 2014). Konsumsi asam-asam itu akan meningkatkan pH yang mengarah pada pengendapan kalsium karbonat ($CaCO_3$) yang bereaksi dengan ion kalsium (Braissant et al., 2002, Knorre and Krumbein, 2000).

De Muynck *et al.* (2010), menjelaskan bahwa urea terdegradasi menjadi ammonium dan karbonat yang menyebabkan nilai pH serta

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

konsentrasi karbonat di lingkungan menjadi meningkat. Adanya ion kalsium dan urea memiliki peran yang sangat penting dalam proses presipitasi kalsium karbonat. Adanya ion kalsium dalam sistem menyebabkan terjadinya pengendapan kalsium karbonat ketika tingkat jenuh tertentu telah tercapai. Proses presipitasi kalsium karbonat sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim urease. Ion kalsium yang berada di dalam sistem akan tertarik ke dinding sel mikroorganisme, karena dinding sel mikroorganisme bermuatan negatif.

Dari hasil uji kemampuan presipitasi isolat bakteri dari gua Kembar kawasan karst Malang ini menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki kemampuan dalam mempresipitasi kalsium karbonat meskipun dengan kadar yang berbeda-beda, hal ini terjadi karena setiap isolat memiliki kemampuan yang berbeda-beda juga dipengaruhi banyak faktor baik dari bakteri atau lingkungan seperti pH, suhu, ukuran bakteri dan konsentrasi sel (Anbu *et al*., 2016, Qabany *et al*., Soon *et al*., 2012). Berat presipitat yang dihasilkan oleh masing-masing isolat memiliki berat yang variatif, dengan hasil berat rata-rata presipitat tertinggi yakni oleh isolat ZG2c sebanyak 0,18985±0,029062 gram dan berat presipitat yang paling rendah dihasilkan oleh isolat ZT5a dengan berat 0,10005±0,019163 gram. Jumlah presipitat yang dihasilkan dalam penelitian ini lebih banyak dibandingkan pada penelitian Ningsih dkk.(2017), hasil uji presipitasi yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat sp. 32, sp. 9, dan sp. 20 mampu membentuk kalsium karbonat dengan berat presipitat berturut-turut 0,129 g, 0,126 g, dan 0,105 g, setelah diinkubasi selama 7 hari pada medium cair yang

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

mengandung urea dan kalsium. Sedangkan pada penelitian Krishnapraya *et al*. (2015), dalam uji kemampuan presipitasi bakteri dari tanah di pabrik semen di dapatkan tiga isolat BI 1, BI 2, dan BI 5 berat presipitat berturut-turut 0,84 g, 0,82 g, dan 0,76 g.

Presipitat yang dihasilkan dari masing-masing bakteri dipengaruhi beberapa hal salah satunya adalah ketersediaan urea sebagai substrat dalam menghasilkan enzim urease yang akan dihidrolisis sehingga bisa menjadi sumber nitrogen bagi bakteri. Pada penelitian Bibi *et al*. (2018), berhasil mengisolasi 18 isolat bakteri ureolitik yang kemudian diamati proses pertumbuhannya. Isolat *Bacillus cereus* QBB88 memiliki pertumbuhan optimal selama 72 jam inkubasi dalam media dengan 20 gram urea di dalamnya. Sedangkan pH mulai naik pada hari kedua dan pH maksimal 8,27 pada hari ketiga. Hal ini menjelaskan bahwa hidrolisis urea maksimal ditunjukkan pada peningkatan pH pada inkubasi 72 jam, hal ini juga menjelaskan penghambatan pertumbuhan karena kelebihan substrat (urea) atau represi katabolik atau peningkatan pH dalam lingkungan mikro sel.

Adapun hal lain yang mempengaruhi kemampuan masing-masing bakteri adalah struktur dan komposisi genetik bakteri ureolitik untuk menjalankan peran penting dalam menghasilkan presipitat komposit biominerals (Weiner dan Dove, 2003). Disamping itu, apabila mikroorganisme mendapatkan susbstrat yang sesuai dalam proses enzimatis dapat mengkatalisasi reaksi kimia yang mengarah pada proses presipitasi kalsium karbonat (Paassen *et al*., 2009, Paassen, 2009).

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Menurut Jianyun *et al.* (2016), bakteri ureolitik yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan kristal $CaCO_3$ memiliki potensi sebagai biobeton dalam teknologi biogrouting yang berfungsi memperkuat struktur beton. Jika terdapat retak mikro pada beton bakteri berfungsi sebagai *self-healing concentrate* yang akan memperbaiki retak mikro pada beton yang retak. Pengaplikasian bakteri ureolitik dalam teknologi biogrouting ini yaitu dengan cara mencampurkan kultur bakteri penghasil enzim urease, substrat (urea), sumber kalsium dan pasir. Cara tersebut telah disederhanakan Reddy *et al*. (2012), yaitu dengan cara bakteri dicampurkan langsung dengan pasir atau diinjeksikan langsung ke pasir. Cairan yang diinjeksikan terdiri dari media nutrisi, urea, dan ion kalsium yang akan diinjeksikn dengan kecepatan tertentu. sedangkan dalam penelitian Ainiyah dkk. (2016), pengaplikasian bakteri ureolitik dalam biogrouting yaitu dengan cara mempurifikasi enzim urease, kemudian diinjeksikan ke dalam pasir. Menurut Suer *et al*. (2009), dalam penelitian potensi menggunakan biogrouting sebagai pendekatan alternatif pada *jet grouting* untuk menutup retakan atau struktur pilling sheet dan batuan dasar. Penelitian mereka menunjukkan bahwa proses biogrouting lebih murah daripada *jet grouting* dan jauh lebih rendah dampak lingkungannya. Biogrouting juga menggunakan lebih sedikit air dan menghasilkan lebih sedikit limbah. Dengan demikian, pemanfaatan enzim urease dari bakteri ureolitik memiliki potensial digunakan dalam teknologi biogrouting.

4.2.4 Identifikasi Genus Bakteri Ureolitik

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Hasil isolasi bakteri ureolitik dari sample tanah di gua Kembar didapatkan 10 koloni isolat bakteri yang berbeda-beda. Isolat bakteri yang telah diperoleh diidentifikasi berdasarkan ciri makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia, uji biokimia yang dilakukan meliputi uji urease menggunakan media urea agar, uji katalase, uji fermentasi gula (sukrosa, laktosa dan glukosa), uji Motilitas Indol Ornithin menggunakan media MIO, uji MR, uji VP, uji sitrat menggunakan media SCA (*Simon Citrate Agar*), dan uji H_2S menggunakan media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*).

Dari semua isolat bakteri yang didapatkan dan diidentifikasi diperoleh 6 genus bakteri ureolitik dari gua Kembar yaitu genus *Bacillus, Solibacillus, Yersinia, Paenibacillus, Klebsiella,* dan *Neisseria.* Bakteri ureolitik dari gua Kembar yang memiliki kemampuan paling optimal dalam presipitasi kalsium karbonat merupakan genus *Bacillus* (ZG1a) sebanyak 0,18985±0,029062 gram dan presipitat paling sedikit dihasilkan oleh genus *Klebsiella* (ZT5a) sebanyak 0,10005±0,019163 gram.

Berdasarkan beberapa penelitian yang pernah dilakukan bakteri ureolitik ditemukan di kawasan gua, batu dan kapur Sarawak, Malaysia Timur. Bakteri ureolitik yang berhasil diisolasi dan diuji kualitatif enzim ureasenya merupakan bakteri *Sporosarcina pasteurii, Sporosarcina luteola, dan Bacillus lentus* (Omoregie *et al*., 2016). Bakteri ureolitik pada tanah berkapur juga ditemukan di India, dari hasil isolasi yang dilakukan ditemukan 5 bakteri yang dapat menghasilkan enzim urease yaitu *Bacillus megaterium, Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis,* dan *Lactobacillus fusiformis* (Dhami *et al*., 2013). Pada penelitian Krishnapraya *et al.* (2015)

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dari isolasi tanah di pabrik semen di Tamil Nadu India didapatkan tiga isolat bakteri yang mampu mempresipitasi kalsium karbonat dan identifikasi sebagai tiga genus *B. megaterium* BSKAU, *B. licheniformis* BSKNAU, dan *B. flexus* BSKNAU.

1. Genus *Bacillus*

Dari hasil pengamatan secara makroskopis memiliki bentuk menyebar seperti akar, tepian seperti akar, dan elevasi timbul pada isolat ZG1a, ZG2c, ZG2d dan ZR4d, namun pada isolat ZG2d memiliki tepian cembung. Ke empat isolat ini memiliki pigmentasi berwarna putih susu. Hasil pengamatan mikroskopis dari pewarnaan Gram merupakan bakteri gram positif yang memiliki bentuk coccobacillus. Pengamatan uji aktivitas biokimia uji katalase positif, uji laktosa negatif, uji glukosa negatif, uji sukrosa negatif, uji VP positif, dan uji indole negatif. Pada isolat ZG2d uji ornithin positif sedangkan ketiga isolat lainnya negatif. Pada uji MR isolat ZR4d positif sedangkan ketiga isolat lain negatif.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat ZG1a, ZG2c, ZG2d, dan ZR4d memiliki kesamaan karakteristik dengan genus *Bacillus* sesuai dengan identifikasi bakteri oleh (Holt *et al*., 1994; Buchanan dan Gibbons, 1974) dalam buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 2nd edition*. Genus *Bacillus* memiliki ciri-ciri berbentuk batang bisa ditemukan di tanah dan air termasuk di dalam air laut. *Bacillus* merupakan bakteri yang mampu membentuk endospora,

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

bersifat gram positif, bersifat motil bergerak menggunakan flagel entritikus, bisa bersifat aerobik atau fakultatif anaerobik serta bersifat katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung saat diinokulaiskan di larutan H_2O_2 (*Hydrogen peroxide*) dimana bakteri genus *Bacillus* bisa memecah H_2O_2 menjadi air dan oksigen (O_2) (Pelczar *et al.*, 1976).

Genus Bacillus memiliki hasil positif pada uji enzim urease, berdasarkan penelitian sebelumnya hal ini menunjukkan bahwa genus *Bacillus* merupakan bakteri ureolitik yang ditandai dengan adanya aktivitas enzim urease (Chahal *et al.*, 2011).

Klasifikasi

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacili

Ordo : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : *Bacillus* (Holt *et al*., 1994)

2. Genus *Solibacillus*

Hasil pengamatan secara makroskopis isolat ZR3c memiliki bentuk koloni seperti akar (*rhizoid*), tepi seperti akar, elevasi benar-benar terlihat (*raised*) serta warna koloni putih susu. Sedangkan pada pengamatan mikroskopis sel bakteri berbentuk coccobacillus atau bacillus dan bersifat gram positif. Uji aktivitas biokimia isolat ZR3c

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

menunjukkan hasil positif pada uji katalase. Hasil negatif ditunjukkan pada uji fermentasi gula sukrosa, glukosa, dan laktosa serta pada uji indole dan VP juga. Dari hasil pengamatan secara makroskopis maupun mikroskopis serta hasil uji aktivitas biokimia isolat ZR3c memiliki kesamaan dengan karakteristik dengan genus *Solibacillus*. Genus *Solibacillus* merupakan genus baru dengan salah satu spesies *Solibacillus silvestris* yang dicetuskan pada tahun 2009 oleh Krisnamurthi *et al* yang sebelumnya masuk pada genus Bacillus silvestris temuan Rheims *et al* pada tahun 1999. Umumnya genus *Solibacillus* ditemukan di lapisan atas tanah di hutan.

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacili

Ordo : Bacillales

Famili : Planococcaceae

Genus : *Solibacillus* (Rheims *et al.*, 1999)

3. Genus *Yersinia*

Berdasarkan pengamatan karakteristik secara makroskopik isolat ZR3f memiliki bentuk koloni bulat (*circular*), tepian bergelombang (*undulate*), elevasi berbentuk cembung (*convex*) dengan warna koloni putih susu. Hasil pengamatan mikroskopik sel bakteri memiliki bentuk sel bacillus (batang) dan bersifat gram negatif.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Pengamatan pada uji kativitas biokimia isolat ZR3f menunjukkan hasil yang positif pada uji katalase dengan ditandai terbentuknya gelembung saat diinokulasikan pada H_2O_2 yang menunjukkan bahwa bakteri mampu menguraikan zat toksik dengan memecah H_2O_2 menjadi air dan O_2 melalui katalisai dari enzim katalase. Pada uji H_2S dengan media TSIA menunjukkan bahwa isolat ZR3f tidak bisa membentuk H_2S. Hasil negatif pada uji MIO bakteri bersifat non motil dan tidak membentuk *indole*. Serta hasil negatif juga ditunjukkan pada uji sitrat, MR, VP dan positif pada uji aktivitas enzim urease. Berdasarkan karakteristik tersebut isolat ZR3f menurut Cowan and Steel (1974), memiliki kesamaan karakter dengan genus *Yersinia*, pada genus *Yersinia* bakteri bersifat aerob hingga fakultatif anaerob, bersifat motil *in vitro* dan non motil *in vivo* bergantung pada spesies spesifiknya dan suhu inkubasi, pada suhu 37^0C bakteri genus *Yersinia* non motil dan motil pada suhu sekitar 30^0C. Hanya pada spesies *Yersinia pestis* selalu bersifat non motil. Umumnya bakteri *Yersinia* kebanyakan diisolasi dari air, beberapa jenis ikan, siput dan juga dari manusia (feses, darah, urin, limpha), binatang (rodent, burung, babi, hewan ternak), dan tanah. Bakteri genus *Yersinia* sebagian besar merupakan bakteri pathogen namun ada juga yang non-pathogen (Holt *et al*., 1994).

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteumbacteria

Kelas : Gammaproteobacteria

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Ordo : Enterobacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : *Yersinia* (Cowan and Steel, 1974)

4. Genus *Paenibacillus*

Berdasarkan pada pengamatan makroskopik koloni bakteri isolat ZR4a dan ZR4e memiliki bentuk seperti akar, tepi seperti akar, elevasi timbul (*raised*) serta berwarna putih susu. Sedangkan pada pengamatan mikroskopis isolat ZR4e sel berbentuk coccobacillus dan sifat gram positif.

Karakteristik isolat ZR4a dan ZR4e pada uji aktivitas biokimia memiliki hasil positif pada uji katalase. Uji fermentasi gula memiliki hasil negatif pada uji gula sukrosa dan laktosa, sedangkan positif pada uji gula glukosa. Pada uji MIO tidak menghasilkan indole, bersifat motil dan ornithin positif. Hasil positif juga ditunjukkan pada uji VP dan aktivitas enzim urease, pada uji sitrat bersifat negatif yang menunjukkan bahwa isolat bakteri ZR4e tidak menggunakan sitrat sebagai sumber nitrogennya, dimana asam tidak dapat dihilangkan dari medium sehingga pH tidak bisa meningkat akhirnya medium tetap berwarna hijau bukan biru.

Berdasarkan Ash *et al*.,(1994) dalam buku Bergey's manual of Systematic Bacteriology, volume 3: The Firmicutes dari pengamatan makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia isolat ZR4e memiliki kesamaan karakteristik dengan genus *Paenibacillus*. Genus

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Paenibacillus didapatkan dari tanah dan larva lebah madu yang mati. Genus *Paenibacillus* merupakan salah satu organisme yang pathogen.

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacili

Ordo : Bacillales

Famili : Paenibacillaceae

Genus : *Paenibacillus* (Ash *et al*., 1994)

5. Genus *Klebsiella*

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis isolat ZT5a memiliki bentuk bulat, tepi rata, elevasi cembung, dan warna koloni putih susu. Sedangkan pada pengamatan mikroskopis isolat ZT5a bersifat gram negatif dengan bentuk sel bacill.Sedangkan pada uji biokimia isolat ZT5a positif pada uji katalase, urease, bersifat non motil dan bersifat negatif pada uji H_2S, tidak menghasilkan indole, dan positif pada uji VP .

Menurut Cowan and Steels (1974) Dari hasil pengamatan makroskopis maupun mikroskopis isolat ZT5a memiliki kesamaan karakteristik dengan genus *Klebsiella*, dimana dalam mengetahui

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

kelompok genus *Klebsiella* hasil positif pada uji VP menjadi salah satu kunci yang penting dan umumnya genus ini sebagian besar mampu menghidrolisis urea, hal ini menunjukkan bahwa genus *Klebsiella* memiliki aktivitas enzim urease. Menurut Buchanan and Gibbons (1975) Umumnya anggota genus *Klebsiella* ini tersebar di lingkungan tanah dan air. Bakteri ini juga ditemukan di saluran pencernaan manusia dan juga terdapat di saluran pencernaan mamalia. Genus *Klebsiella* dalam dunia medis sudah tidak asing yang termasuk dalam organisme patogen.

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Klebsiella* (Cowan and Steel, 1974)

6. Genus *Neisseria*

Berdasarkan pengamatan secara makroskopis isolat ZG1f memiliki bentuk koloni bulat, tepi rata, elevasi cembung dan warna koloni putih susu. Sedangkan pada pengamatan mikroskopis isolat ZG1f bersifat gram negatif dan memiliki bentuk sel diplococcus.

Berdasarkan uji biokimia isolat ZG1f merupakan bakteri yang bersifat katalase positif, uji ornithin positif, uji MR negatif, uji VP positif yang ditunjukkan adanya warna merah pada medium yang berarti isolat

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

ZG1f mampu memproduksi acetylmethyl carbinol dari fermentasi glukosa, dan uji aktivitas enzim urease positif. uji sitrat menunjukkan hasil yang negatif ditandai dengan media yang tetap berwarna hijau tidak berubah menjadi warna biru, hal ini menunjukkan bahwa isolat ZG1f tidak bisa memfermentasikan asam (simmone sitrat).

Dari hasil pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, dan uji biokimia menurut Cowan and Steel (1974) dalam buku *Bergey's of Determinative Bacteriology 9th Edition* isolat ZG1f memiliki kesamaan karakter dengan genus *Neisseria* yang merupakan gram negatif dengan bentuk dua sel coccus atau disebut diplococcus dan tergolong bakteri yang bersifat aerobic. Beberapa spesies bersifat pathogen seperti *Neisseria gonorohea* yang menyebabkan penyakit kencing nanah.

Klasifikasi :

Kingdom : Bacteria

Filum : Proteobacteria

Kelas : Betaproteobacteria

Ordo : Neisseriales

Famili : Neisseriaceae

Genus : *Neisseria* (Cowan and Steel, 1974)

4.2.5 Integrasi Ayat Al-Quran terhadap Pemanfaatan Bakteri

Dalam mengerjakan penelitian ini sekiranya kita akan selalu mengingat Allah SWT yang telah menciptakan langit dan bumi yang di

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

dalamnya terdapat banyak tanda-tanda kekuasaanNya. Sebagaimana dalam firman Allah SWT dalam surat Al Baqarah 2: 26.

۞إِنَّ ٱللَّهَ لَا يَسۡتَحۡيِۦٓ أَن يَضۡرِبَ مَثَلٗا مَّا بَعُوضَةٗ فَمَا فَوۡقَهَاۚ فَأَمَّا ٱلَّذِينَ ءَامَنُواْ فَيَعۡلَمُونَ أَنَّهُ ٱلۡحَقُّ مِن رَّبِّهِمۡۖ وَأَمَّا ٱلَّذِينَ كَفَرُواْ فَيَقُولُونَ مَاذَآ أَرَادَ ٱللَّهُ بِهَٰذَا مَثَلٗاۘ يُضِلُّ بِهِۦ كَثِيرٗا وَيَهۡدِي بِهِۦ كَثِيرٗاۚ وَمَا يُضِلُّ بِهِۦٓ إِلَّا ٱلۡفَٰسِقِينَ ٢٦

Artinya : Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, mereka tahu bahwa itu kebenaran dari Tuhan. Tetapi mereka yang kafir berkata, "Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?" Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang dibiarkan-Nya sesat, dan dengan itu banyak (pula) orang yang diberi-Nya petunjuk. Tetapi tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu selain orang-orang fasik..

Ibnu Katsir menafsirkan kata "yang lebih kecil dari itu" menunjukkan bahwa Allah SWT memiliki kuasa untuk menciptakan apa saja, baik yang besar atau yang lebih kecil sekalipun. Allah tidak pernah menganggap remeh sesuatu pun yang Dia ciptakan meskipun hal itu kecil. Ayat tersebut menjelaskan bahwa orang-orang yang beriman meyakini bahwa dalam perumpamaan penciptaan yang dilakukan oleh Allah SWT memiliki manfaat bagi kehidupan manusia (Al-Mubarok, 2006). Hal ini sebagaimana penciptaan Allah terhadap bakteri yang ukurannya lebih kecil dari nyamuk, Allah menciptakan makhluk hidup tidak hanya merugikan tetapi juga menguntungkan. Mikroorganisme yang memiliki ukuran sangat kecilkun dapat dimanfaatkan dalam banyak hal, salah satunya bakteri ureolitik dari gua Kembar Malang yang memiliki kemampuan dalam mempresipitasi kalsium karbonat ($CaCO_3$) yang bisa digunakan untuk mengatasi keretakan

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

mikro yang terjadi pada suatu bangunan atau biasa disebut dengan teknologi biogrouting.

Hal ini menunjukkan kekuasaan Allah yang begitu besar untuk menciptakan segala sesuatu yang dikehendakinya.dalam ayat tersebut sudah dijelaskan bahwa ada orang-orang yang diberi petunjuk dengan perumpaan tersebut. Apabila kita mau meyakini bahwa segala yang Allah ciptakan memiliki manfaat, tapi apabila kita tidak mencoba mempelajarinya maka kita tidak tahu apa manfaat dari apa yang telah Allah ciptakan. Maka seharusnyalah manusia memperhatikan dan merenungkan rahmat Allah yang Maha Suci karena dengan memperhatikan isi semuanya akan bertambah yakinlah dia pada keesaan dan kekuasaanNya, akan bertambah luas pulalah ilmu pengetahuannya mengenai alam ciptaanNya dan dapat pula dimanfaatkannya ilmu pengetahuan itu.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

a. Bakteri ureolitik dari gua Kembar didapatkan 10 isolat yang masuk dalam 6 genus bakteri yaitu *Bacillus*, *Solibacillus*, *Yersinia*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, dan *Neisseria*.

b. Dari 10 isolat bakteri ureolitik memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam uji kemampuan preispitasi kalsium karbonat. Berat presipitat tertinggi dihasilkan oleh genus *Bacillus* (isolat ZG2c) sebanyak 0,18985±0,029062 gram dan berat presipitat terendah dihasilkan oleh genus *Klebsiella* (isolat ZT5a) dengan berat 0,10005±0,019163 gram.

5.2 Saran

a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara molekuler untuk mengetahui hingga tingkat spesies bakteri ureolitik dari gua Kembar, Malang.

b. Diharapkan isolat bakteri ureolitik dapat diteliti lanjut kemampuannya dalam pemanfaatan untuk teknologi biogrouting.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Achal, V. and Pan, X. 2011. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and their role in calcite precipitation, *Current Microbiolology*, 62(3), pp. 894-902.

Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., and Reddy, M. S. 2009. Strain Improvement of *Sporosarcina pasturii* for Enhanced Urease and Calcite Production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*,36(7), 981-988.

Achal, V., Pan, X. and Zhang, D. 2011. Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1 based on microbially induced calcite precipitation, *Ecological Engineering*, 37, pp. 1601–1605.

Alhour, M. T. 2013. *Isolation, Characterization and Application of Calcite Producing Bacteria from Urea Rich Soils.* Unpublished MSc thesis, Islamic University of Gaza, Gaza, Palestine.

Al-Thawadi, S.M. 2008. High strength in-situ biocementation of soil by calcite precipitating locally isolated ureolytic bacteria. Ph.D dissertation. Murdoch University, Western Australia.

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J. and So, J. S. 2016. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications, *Springerplus*, 5, pp. 250-262.

Ash, Priest and Collins. 1994. In : (Eds) P.D. Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman. Bargey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 3: The Firmicutes, Springer, 269-295.

Atlas RM and Bartha R. 1993. Microbial Ecology: Fundamentals an Applications, Third edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Barathi, N. 2012. Calcium carbnoate precipitation with growth profile of isolated ureolytic strains. *International Journal of Sience and Research*, 3(9), 2045-2049.

Barr, TC. 1968. Cave ecology and the evolution of troglobites. *Evolutionary Biology* 2: 35-102.

Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 1993. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria third edition. Cambridge University Press, Camridge.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Barton, H. A and Jurado, V. 2007. What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves . *Microbe*.2 (3), 132-138.

Barton, H.A., M.R Taylor, dan N.R. Pace. 2004. Molecular Phylogenetic Analysis of A Bacterial Community in An Oligotrophic Cave Environment. *Geomicrobial J*. 21: 11-20.

Bibi, S., Oualha, M., Ashfaq, M.Y., Sulaeiman, M.T., dan Zouari, N. 2018. Isolation, differentiation and biodiversity of ureolytic bacteria of Qatari soil and their potential in microbially induced calcite precipitation (MICP) for soil stabilization. RSC Adv., 2018, 8, 5854–5863.

Bisen, P. S. 2004. Microbial Staining. *Microbes in Practice.* 1 ed. New Delhi: IK International pp. 139-155.

Boquet, E., Boronat, A., and Ramos-Cormenzana, A. 1973. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature* 246:527–529.

Boston PJ. 1999. A bit of peace and quiet: The microbes of Lechuguilla. *NSS News.* 57(8): 237-238.

Braissant, O., Verrecchia, E. P. and Aragno, M. 2002. 'Is the contribution of bacteria to terrestrial carbon budget greatly underestimated?', *Naturwissenschaften,* 89(8), pp. 366-370.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston J., Murray R.G.E., Niven C.F., Ravin A.W., Stanier R.W. 1974. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eight Edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

Cacchio, P., Ercole, C., Cappuccio, G., and Lepidi,A. 2003. Calcium carbonate precipitation by bacterial strains isolated from a limestone cave and from a loamy soil. *Geomicrobiology Journal.*; 20, 85-98.

Cappuccino J.G. and Sherman N. 1987. *Microbiology a laboratory manual.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City.

Castanier S, Le M´etayer-Levrel G, Perthuisot J-P. 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. Sediment Geol 126:9–23.

Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., & Perthuisot, J. P. 2000. Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. In Riding, R.E., Awramik & S.M. (Eds.), Microbial Sediments (pp. 32-39). Heidelberg: Springer-Verlag.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., Orial, G., Loubière, J.-F. and Perthuisot, J.-P. 2000. Bacterial Carbonatogenesis and Applications to Preservation and
Restoration of Historic Property, in Ciferri, O., Tiano, P. & Mastromei, G. (eds.) *Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*. Boston, MA: Springer US,pp. 203-218.

Collins, C. M. and D'Orazio, S. E. 1993. Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis, *Molecular Microbiology,* 9(5), pp. 907-913.

Corry, J. h., J. Atabay, Forsythes, and L. Mansfield. 2003. *Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacter and arcobacters. In: Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier, Amsterdam.

De Muynck, W., Belie, D. N., and Vestraete, W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: a review. *Ecological Engineering,* 36(2), 118-136.

De-Belie, N. and De-Muynck, W. 'Crack repair in concrete using biodeposition'. *Proceedings of the 2nd International Conference on Concrete Repair, Rehabilitation, and Retrofitting (ICCRRR)*, Cape Town, South Africa. CRC Press/Balkema, Leiden, The Netherlands, 777-781.

De-Muynck, W., Debrouwer, D., DeBelie, N. and Verstraete, W. 2008. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials, *Cement and Concrete Research,* 38, pp. 1005–1014.

Dhami, N. K., Reddy, M. S. and Mukherjee, A. (2013c) '*Bacillus megaterium* mediated mineralization of calcium carbonate as biogenic surface treatment of green building materials', *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 29(12), pp. 2397-2406.

Dhami, N. K., Reddy, M. S. and Mukherjee, A. 2013. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareoussites, *Journal of Microbiology and Biotechnology,* 23(5), pp. 707-714.

Dhami, N. K., Reddy, M. S. and Mukherjee, A. 2014. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages, *Frontiers in microbiology,* 5, pp. 304.

Dunbar J, Takala S, Barns SM, Davis JA, and Kuske CR. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1662-1669. ecosystem. *Science* 272: 1953-1955.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Elliott dan Reddell, 1989 Elliott W and Reddell J. 1989. The status and range of five endangered arthropoda from caves in the Austin, Texas, region. A report on a study supported by the Texas Parks and Wildlife Department and the Texas Natural Conservancy for the Austin Regional Habitat Conservation Plan. 100 pp.

Engel, *et al*. 2001 Engel AS, Porter ML, Kinkle BK, and Kane TC. 2001 Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia *Geomicrobiology Journal* 18: 259-274. *Environmental Microbiology* 56: 2108-2113.

Febria, F, A., Saputra, R., dan Nasir, N. Bakteri pada Ornamen Gua Baba Sumatera Barat yang Memiliki Aktivitas Urease sebagai Dasar Kajian Biogrouting. *Prosiding Semirata bidang MIPA BKS-PTN Barat*. Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan.

Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. 2007. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, 12th Ed. Elsevier, Canada.

Ford, D. C and Williams, P. 1989. Karst Geomorphology and Hydrology. McGraw-Hill Book Company, London.

Ford, D. C and Williams, P. 1992. Karst Geomorphology and Hydrology. Chapman Hall, London.

Fortier, L.-C. and Moineau, S. 2009. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. *Bacteriophages*: Springer, pp. 203-219.

Geeta, S., and Mehrotra, R.S. 2009. Principle of microbiology (1st ed.). Tata McGraw Hill Education Limited, New Delhi.

Gillieson, D. 1996. Caves: Process, Development, Management. Blackwell Publishers Ltd, Camridge.

Gusmawati, N. F., Savitri, C. K., Puspita, L., dan Fahrulozy. 2001. Seleksi Bakteri Urease Untuk Teknologi Biogrouting. *Jurnal Kelautan Nasional*.; Vol.5, No.1.

Hammes, F., and Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. Reviews in Enviromental Sience and Biotechnology, 1(1), 3-7.

Hammes, F., Boon, N., de Villiers, J., Verstraete, W. and Siciliano, S. D. 2003b. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), pp. 4901-4919.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Hammes, F., Boon, N., Villiers J.D. 2003. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. Appl Environ Microbiol 69:4901-4909.

Haryono, E dan Adji, T, N. 2004. Geomorfologi dan Hidrologi Karst. Bahan Ajar. Fakultas Geografi Universitas Gadjah Mada.

Hoffman L. 1989. Algae Of Terresterial Habitat. *The Botanical Review* 55: 78-91.

Holt, J.G., Krig, N.R., Sneath P., Staley, J., and Williams, S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition, Lipincott Williams and Wilkins Company, Philadelphia (USA).

Howarth FG. 1983. The conservation of Hawaii's cave resources. *he Newsletter of Cave Conservation and Management* 2(1-2): 19-23.

IMAPALA UB. 2012. Karst di Desa Kedungsalam Tinjauan Speleologi. Universitas Brawijaya, Malang.

Jagnow DH, Hill, CA, Davis DG, DuChene HR, Cunningham KI, Northup DE, and QueenJM. 2000. History of the sulfuric acid theory of speleogenesis in the Guadalupe Mountains, New Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(2): 54-59.

Jennings, J. N. 1985. Karst Geomorphology. Basil Blackwell, Oxford.

Jianyun, W. Y. C. Ersan, N. Boon, and N. De Belie. 2016. "Application Of Microorganisms In Concrete: A Promising Sustainable Strategy To Improve Concrete Durability," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 7, pp. 2993–3007.

Jimenez L. 1990. Molecular analysis of deep-subsurface bacteria. *Applied and*

Jonkers, H. M. 2007. Self healing concrete: a biological approach, in van der Zwaag, S. (ed.) *Self Healing Materials: An alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science*. Netherlands: Springer, pp. 195–204.

Jonkers, H. M. and Schlangen, E. 'Crack repair by concrete-immobilized bacteria', *Proceedings of the First International Conference on Self Healing Materials*, Noordwijk aan Zee, The Netherlands: Springer 7.

Jutono, J, S., Hartadi, S., Kabirun, S., Darmosuwito., dan Soesanto. 1980. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Koilraj A. J, Marimuthu.G, *P P* Natarajan. K, Saravanan. S, Maran.P, and Hsu.M.J. 1999. Fungal diversity inside caves of Southern India. *Curr. Sc.*, **77:** 1081- 1084.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Komala, T., and Khun, T.C. 2013. Calcite-Forming Bacteria Located In Limestone Area Of Malaysia. *Journal of Asian Scientific Research*.; 3(5):471-484.

Krajewska, B. 2009. "Ureases 1. Functional, Catalytic and Kinetic Properties□: A review," *Sci. Res. Essays*, vol. 7, pp. 2104–2111.

Krishnapriya, S., Babu, D. L. V., & Arulraj, G. P. 2015. Isolation and identification of bacteria to improve the strenght of concrete. *Microbiological Research*, 174,48-55.

Krisnamurthi, S., T. Chakrabarti and E. Stackebrandt. 2009. Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris*. Rheims *et al*. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov. IJSEM 59, 1054-1058.

Kroll, A. 2003. Biomineralization and evolutionary history, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54, pp. 329–356.

Kuske dkk., 1997 Kuske CR, Barns SM, and Busch JD. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3614-3621.

Lavoie K, Northup D and Boston P. 2000. Sight Unseen: Microbes in Caves. *NSS News* (March) 68-69.

Lee, Y.N. 2003. Calcite production by Bacillus amyloliquefaciens CMB01. *Journal of Microbiology*.; Vol. 4, no. 4.

Lewin, B. 1994. Genes V., *American Journal of Physical Anthropology*: Wiley Subscription Services. A Wiley Company, Inc.

MacFaddin, J. F. 2000. *Biochemical tests for the identification of medical bacteria.* 3rd edn. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Michael, J., Pelczar, Jr., Chan, E.C.S., and Noel, K.R. 1998. Microbiology (5th ed.). Tata McGraw Hill Education Private Limited, New Delhi.

Mobley, H. L. and Hausinger, R. P. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *FEMS Microbiology Reviews*, 53(1), pp. 85-108.

Mobley, H. L. T. 2001. Urease, in Mobley, H.L.T., Mendz, G.L. & Hazell, S.L. (eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press, Washington (DC), United States of America.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Mobley, H. L., Island, M. D. and Hausinger, R. P. 1995 Molecular biology of microbial ureases, *FEMS Microbiology Reviews*, 59(3), pp. 451-480.

Mora, D. and Arioli, S. 2014. Microbial Urease in Health and Disease, *PLoS Pathogens*, 10(12), pp. e1004472.

Muynck, W. D., Belie, N.D., and Verstraete, W. 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. Ecol Eng 36:118-136.

Ningsih, M.D.S., Linda, T.M., dan Fibriarti, B.L. 2017. Isolasi dan keragaman bakteri ureolitik lokal riau yang berpotensi sebagai campuran beton. Journal of Biology, 11(1), 2018, 57-63.

Ningsih, S., Lisdiyanti,)., Pertiwi, M., dan Prasetyo, E.N. 2016. Biogrouting: Produksi Urease dari Bakteri Laut (*Oceanobacillus* sp.) Pengendap Karbonat. Biota Vol. 1 (1): 9-18.

Noel R. K., James T., S, Daniel R. B., Brian, P., Hedlund, Bruce, J., Paster, Naomi L., Ward, W.L., and William B. W. 2010. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Four. Springer, New York.

O'Donnell AG, Goodfellow M, and Hawksworth, DL. 1994. Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London* 345: 65-73.

Omoregie A.I. 2016. Characterization Of Ureolytic Bacteria Isolated From Limestone Caves Of Sarawak And Evaluation Of Their Efficiency In Biocementation. Thesis. Swinburne University Of Technology.

Orr WL. 1977. Geologic and geochemical controls on the distribution of hydrogen sulfide in natural gas. In: *Advances in Organic Geochemistry*, Campos R and Goni J (eds.), Madrid, Empressa nacional adaro de investigaciones mineras, p. 571-597.

Paassen, L. A. v. 2009. *Biogrout Ground Improvement by Microbially Induced Carbonate Precipitation.* Unpublished doctoral thesis, Delft University of Technology, Delft, Netherlands.

Paassen, L. A. v., Harkes, M. P., Zwieten, G. A. v., Zon, W. H. v. d., Star, W. R. L. v. d. and Loosdrecht, M. C. M. v. 2009.'Scale up of BioGrout: a biological ground reinforcement method Agrandissement de BioGrout: méthode biologique pour la consolidation des sols'. *Proceedings of the 17th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering*, 2328-2333.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Palmer AN. 1991. Origin and morphology of limestone caves. *Geological Society of America Bulletin* 103: 1-21.

Pelczar MJ Jr, Chan ECS, Noel KR. 1998. Microbiology. 5th ed. Tata McGraw Hill Education Private Limited, New Delhi.

Poulson, T. L. and White, W. B. 1969. The cave environment. *Science*. 165: 971–981.

Prescott, L. M., Harley, J. P., dan Klein, D. A. 2005. Microbiology. Mc-Graw-Hill, New York.

Qabany, A. A., Soga, K. and Santamarina, C. 2012 'Factors affecting efficiency of microbially induced calcite precipitation', *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 138, pp. 992–1001.

Rahmadi, C. 2007. Ekosistem Karst dan Gua. *Makalah Bidang Zoologi*. Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong.

Ramachandran, S. K., Ramakrishnan, V. and Bang, S. S. 2001. Remediation of Concrete Using Microorganisms, *ACI Materials Journal*, 98(1), pp. 3-9.

Ratledge, C. 2001. *Biochemistry and physiology of growth and metabolism. Basic Biotechnology* Cambridge Cambridge University Press, p. 17-44.

Reddy, M. S., Achal, V. and Mukherjee, A. 2003. 'Microbial concrete, a wonder metabolic product that remediates the defects in building structures', *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment.*, USA: Springer Publishers, 547–568.

Rukmana, G., dan Zulaika, E. 2017. Isolasi Bakteri Karbonoklastik dari Pegunungan Kapur. JURNAL SAINS DAN SENI ITS Vol. 6, No. 2.

Rusterholz dan Mallory 1994 Rusterholz KJ and Mallory LM. 1994. Density, activity, and density of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microbial Ecology* 28:79-99.

Sagripanti, J.L., and Bonifacino, A. 1996. Comparative sporicidal effects of liquid chemical agents.Appl Environ microbiol, 62 (2) (1996), p. 545.

Sarayu, K., Iyer, N. R. and Murthy, A. R. 2014. Exploration on the biotechnological aspect of the ureolytic bacteria for the production of the cementitious materials--a review, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), pp. 2308-2323.

Sarbu SM, Kan TC, and Kinkle BK. 1996. A chemoautotrophically based cave

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Shengyou, X dan He Shiyi. 2002. The CO_2 Regime of Soil Profile and Its Drive to Dissoluion of Carbonate Rocks. Karst Process and The Carbon Cycle Final Report of IGCP379, 83-89.

Shields, P. and Cathcart, L. (2013) 'Oxidase Test Protocol', *American Society for Microbiology* pp. 1-10.

Shields, P. and Cathcart, L. 'Motility Test Medium Protocol', *The 18th Annual Americal Society for Microbiology Conference for Undergraduate Educaters*, New Orleans, Louisiana, United States of America: ASM MicrobeLibrary, 1-7.

Soon, N. W., Lee, L. M., Khun, T. C. and Ling, H. S. 2013. Improvements in engineering properties of soils through microbial-induced calcite precipitation, *The Korean Soceity of Civil Engineering Journal of Civil Engineering*, 17(4), pp. 718-728.

Stevens TO, and McKinley JP. 1995. Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270: 450-454.

Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K. and Bang, S. S. 1999. Microbiological precipitation of $CaCO_3$, *Soil Biology and Biochemistry*, 31, pp. 1563-1571.

Suer, P., Hallberg, N., Carlsson, C., Bendz, D. and Holm, G. 2009. 'Biogrouting compared to jet grouting: environmental (LCA) and economical assessment', *Journal of Environmental Science and Health*, 44(4), pp. 346-353.

Sujoy, B., and A. Aparna. 2013. Enzymology, Immobilization and Application of Urease Enzyme, *Int. Res. J. Biol. Sci*, vol. 2, pp. 51–56.

Summerfield, M, A. 1991. Global Geomorphology. John Wiley and Son, New York.

Tang, H. H., & Dove, P. M. 1997. Surface site-specific interaction of Aspartate with calcite during dissolution; Implication for biomineralization. American Mineralogist, 82, 878-887.

Taylor dan Webb 2000 Taylor SJ and Webb DW. 2000. Groundwater chemistry and bacterial fauna of four large caves in Illinois' Salem Plateau. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(1): 32.

Tiano, P., Biagiotti, L., & Mastromei, G. 1999. Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: Methods of evaluation. Journal of Microbiological Methods, 36, 139-145.

Tille, Patricia M. 2017. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology Fourtheen Edition. Elsevier, China.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id

Trudgil, S. 1985. *Limestone Geomorphology*. Longman, New York.

Waluyo, L. 2004. Mikrobiologi Umum. UMM Press, Malang.

Watve MG and Gangal RM. 1996. Problems in measuring bacterial diversity and a possible solution. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4299-4301.

Wei, S., Cui,H. Jiang, Z., Liu, H., He, H., and Fang , N. 2015. Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 2, no. 46, pp. 455–464.

Weiner, S. and Dove, P. M. (2003) 'An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect ', *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, pp. 1-29.

Weiner, S. and Dove, P. M. 2003. An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, pp. 1-29.

Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L. and Weiner, S. 2002. 'Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite',
Journal of Experimental Zoology, 293(5), pp. 478-491.

Went, F. W. 1969. Fungi Associated with Stalactite Growth. *Sience* 166, 385-386.

Whiffin, V. S. 2004. *Microbial CaCO3 Precipitation for the production of Biocement.* Unpublished doctoral thesis, Murdoch University, Perth, Australia.

White, WB. 1997. Thermodynamic equillibrums kinetics, activation barriers, and reaction mechanisms for chemical reactions in karst terrains. *Environmental Geology* 30: 46-58.

digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id digilib.uinsby.ac.id