

BIOGROUTING: Produksi Urease Dari Bakteri Laut (*Oceanobacillus* sp.) Pengendap Karbonat

Sidratu Ainiyah¹, Endry Nugroho Prasetyo¹, Puspita Lisdiyanti² dan Maharani Pertiwi Koentjoro¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

²Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI, Cibinong

e-mail: endry@bio.its.ac.id

Abstrak— *Biogrouting* adalah teknologi yang mensimulasikan proses diagenesis yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir (*calcarinite/sandstone*). Permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana mengoptimasi produk urease dengan melakukan uji aktifitas, mengisolasi, mempurifikasi dan mengkarakterisasi urease serta mengaplikasikannya sebagai material *grout*. Uji aktifitas dan optimasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Oceanobacillus* sp. pada 2 variasi medium (B4 urea dan B4 urin), 5 variasi pH (4-8) dan 2 variasi suhu (25°C dan 29°C). Hasil uji aktifitas dan optimasi selanjutnya dipurifikasi menggunakan ammonium sulfat (Uji Bradford) dan dicari titik isoelektriknya. Kemudian hasil protein presipitat dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa aktifitas urease paling tinggi adalah 70.21 unit/ml. Urease optimal dihasilkan pada isolat yang ditumbuhkan pada B4 urea pada pH 7 temperatur 25°C. Berat molekul urease yang dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE adalah 440 kDa, sedangkan titik isoelektriknya pada pH 6. Urease dapat dijadikan material *grout* karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi pada aplikasi sederhana *biogrouting*.

Kata Kunci— *Biogrouting*, *diagenesis*, *Oceanobacillus* sp., *urease*.

I. PENDAHULUAN

GROUT adalah material konstruksi yang terdiri dari suspensi (semen, tanah, lempung, *pozzolan*, bentonite dan lain-lain) bahan kimia seperti silikat, uretan, urea, akrilamid yang digunakan sebagai pengeras [1]. Proses pengisian material konstruksi pada pori dan celah diantara partikel tanah dengan kedalaman tertentu dikenal sebagai *grouting*. *Grouting* dapat digunakan untuk memperbaiki struktur tanah karena pengendapan *grout* dapat mengubah karakter fisik tanah [2],[3]. Sampai saat ini *grouting* untuk tujuan rancang bangun dilakukan secara kimia menggunakan presipitasi silika (*waterglass*) [1]. Silika secara spontan dapat mengendap ketika dicampur dengan asam bikarboksilat. Reaksi ini merupakan kelemahan *grouting* secara kimia, karena hanya dapat diaplikasikan pada titik injeksi terdekat dengan tanah yang diperbaiki strukturnya [4].

Di Indonesia metode *grouting* secara biologi (*biogrouting*) mulai dikembangkan lima tahun terakhir. *Biogrouting* merupakan teknologi yang mensimulasikan proses diagenesis, yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir [5]. Secara alami, proses ini memerlukan waktu hingga jutaan tahun. Menurut Van Paasen (2008) proses diagenesis tersebut dapat dipercepat menggunakan bakteri penghasil urease [1].

Aplikasi bakteri laut sebagai material *grout* telah banyak dilakukan [5]. Keterbatasan faktor abiotik, seperti pH dan suhu menyebabkan kurang optimalnya proses *biogrouting* [6]. Penelitian yang dilakukan oleh Keikha *et al* (2012) menggunakan isolat bakteri laut (*Bacillus* sp.) menunjukkan bahwa aplikasi secara langsung pada pasir kurang efisien dalam proses diagenesis. Hal ini disebabkan isolat *Bacillus* sp. sulit masuk ke dalam pori-pori tanah. Berdasarkan penelitian, material *grout* dari urease dapat diaplikasikan pada pasir dengan kondisi salin selama 24 jam. Proses *grouting* ditandai dengan memadatnya pasir dan perubahan pH tanah menjadi basa.

Kaltwasser (1972) dan Ramakhrisan *et al* (2001) menyebutkan bahwa salah satu cara untuk meningkatkan efisiensi dan meminimalisir dampak terhadap lingkungan adalah memanfaatkan urease sebagai material *grouting*. Urease merupakan enzim yang dihasilkan oleh bakteri laut pengendap karbonat. Urease berperan sebagai katalisator dan tidak bersifat toksik [7],[8]. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi, mengisolasi serta mengkarakterisasi produksi urease dengan memvariasikan kondisi pertumbuhan bakteri dan komposisi mediumnya. Urease yang diperoleh selanjutnya diaplikasikan secara sederhana dalam proses *biogrouting*.

Pentingnya urease dalam proses *biogrouting* dan sampai sekarang belum ada penelitian mengenai produksi urease sebagai material *grout* [9], maka dalam penelitian ini dilakukan produksi melalui pengukuran titik isoelektrik, purifikasi menggunakan ammonium sulfat dan karakterisasi menggunakan SDS-PAGE, serta aplikasinya dalam proses *biogrouting*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada medium B4 urea dengan pH 7 dan temperatur 25°C, sedangkan pada medium B4 urin bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada temperatur 25°C dan pH 8. Pengukuran aktifitas urease mencapai 144.12 unit/ml. Berdasarkan karakterisasi protein menggunakan ammonium sulfat, protein mengendap maksimal pada konsentrasi 90% (70.21 unit/ml). Titik isoelektrik urease adalah pada pH 6 dan memiliki berat molekul 440-500 kDa. Urease dapat dijadikan material *grout* karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi (diagenesis) pada aplikasi sederhana *biogrouting* menggunakan pasir laut dengan kondisi salin.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan mulai Januari 2014 sampai bulan Juni 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Intitut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor dan Laboratorium Penyakit Tropis(TDC/Tropical Disease Center) Universitas Airlangga.

B. Metode yang Digunakan

Optimasi dan Uji Aktifitas Urease

Isolat *Oceanobacillus* sp. ditumbuhkan dalam medium produksi (*marine agar*) dan medium yang mengandung urin. Urin yang digunakan adalah urin wanita tidak hamil, usia 22 tahun, dan memiliki pH 5. Diinkubasi pada inkubator bergoyang (*rotary shaker*) 150 rpm pada suhu ruang (30°C) selama 72 jam. Aktivitas urease diukur menggunakan metode *Weatherburn* (1967) yang dimodifikasi (Gambar 1), yaitu Na₂HPO₄ digunakan dalam larutan alkalin hipoklorit dibandingkan dengan NaOH dan waktu pembentukan warna ditambah dari 20 menit menjadi 30 menit.

Reaksi dilakukan dalam tabung reaksi yang berisi 100 µl sampel, 500 µl urea 50 mM dan 500 µl buffer KH₂PO₄ 100 mM (pH 8,0) sehingga total volume adalah 1,1 ml. Campuran reaksi diinkubasi dalam *water bath* dengan suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µl campuran reaksi ke dalam tabung yang berisi 1000 µl larutan phenol-sodium nitroprusside. Larutan alkalin hipoklorit sebanyak 1000 µl ditambahkan ke dalam tabung dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm dan dibandingkan dengan kurva standar (NH₄)₂SO₄. Satu unit enzim berarti jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 µmol NH₃ dari urea per menit dalam kondisi standar [10].

Isolasi dan Purifikasi Urease

Metode Presipitasi Protein Menggunakan Amonium Sulfat

Protein ekstrak kasar yang dihasilkan dari proses sentrifugasi dipresipitasi dengan ammonium sulfat hingga mencapai konsentrasi ammonium sulfat 100%. Setelah proses presipitasi didapatkan endapan protein yang kemudian diresuspensikan menggunakan buffer salin fosfat hingga didapat protein presipitat sebanyak 10 ml. Protein presipitat yang dihasilkan kemudian ditentukan konsentrasinya menggunakan metode Bradford [11].

Metode Isoelektrik Point

Titik Isoelektrik merupakan daerah tertentu dimana protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan negatif sama, sehingga tidak bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Pada pH isoelektrik (pI), daya kelarutan protein minimal, sehingga menyebabkan protein mengendap [12].

Pertama disiapkan 9 tabung reaksi bersih dan kering, lalu dimasukkan 1 ml urease pada tiap-tiap tabung. Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat masing-masing dari pH 4; 5 dan 6. Kemudian dikocok, lalu dicatat derajat kekeruhannya setelah 0, 10, dan 30 menit. Diamati berapa tabung yang terbentuk endapan maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air. Diamati hasilnya. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik [13].

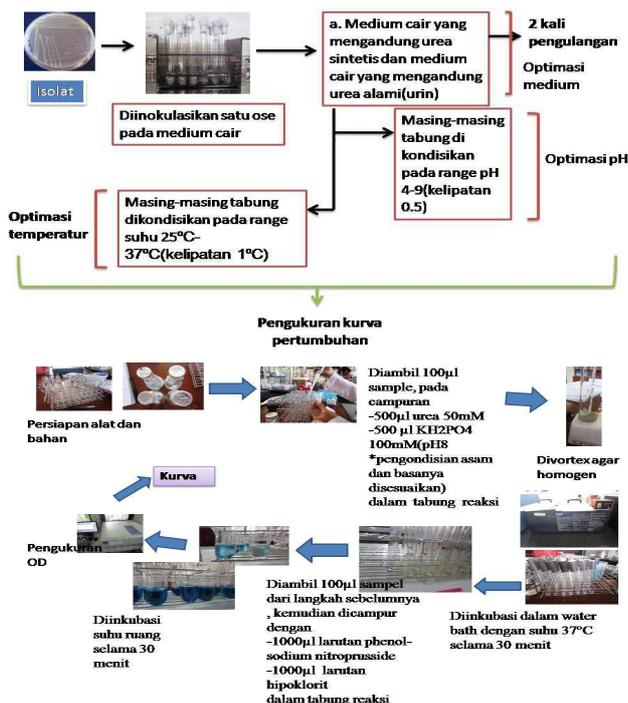
Karakterisasi Urease

Elektroforesis SDS-PAGE

Karakterisasi protein menggunakan SDS-Page bertujuan untuk mengetahui berat molekulnya (BM). Protein yang telah diberi perlakuan dengan detergen yang mengandung ion kuat seperti *sodium dodesyl sulphate* (SDS) dan agen pereduksi akan mengalami eliminasi struktur [14]. Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode *Edelstein and Bollag* (1991) [15]. Bahan untuk separating gel dicampur satu persatu dengan memasukkan TEMED (Tetramethylethylenediamine) pada akhir campuran. Larutan tersebut diaduk dan dipipet perlahan ke dalam plate kaca sampai 1.5 cm dari permukaan kaca lalu didiamkan sekitar 15-20 menit. Dalam proses ini diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Setelah gel memadat, campuran *stacking gel* dipipet perlahan ke dalam plate kaca lalu dengan segera dimasukkan sisir (10 sumur) sebagai tempat memasukkan sampel.

Sampel yang telah dipanaskan pada 100°C selama 3 menit dicampurkan dengan buffer sampel lalu dilakukan *loading* sampel ke dalam sumur sebanyak 12 µl. Berbeda halnya dengan sampel, Marker yang di-*loading* ke dalam sumur sebanyak 10 µl. Sebelum *running* dilakukan, buffer elektroforesis dimasukkan ke dalam chamber. *Running* elektroforesis dilakukan pada 120 Volt, 28 A dalam kondisi dingin. Waktu yang diperlukan untuk *running* elektroforesis sekitar 1.5 jam.

Setelah pemisahan, gel dilepas dari plate kaca lalu direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat) selama 1 jam. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam larutan etanol 50% selama 20 menit dan larutan etanol 30% selama 2 x 20 menit. Setelah itu, gel tersebut direndam dalam larutan *enhancer* (larutan Na₂S₂O₃.5H₂O) selama 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan akuabides selama 3 x 20 menit. Setelah dicuci dengan akuabides, gel direndam dalam



Gambar 1. Optimasi dan Uji Aktivitas Urease Menggunakan Kurva Standart

larutan *staining* silver nitrat (larutan AgNO_3 + formaldehida 37%) selama 30 menit lalu dibilas cepat dengan akuabides selama 2 x 20 detik. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan *destaining* (larutan Na_2CO_3 + formaldehida 37%) sampai diperoleh pita-pita protein yang jelas teramati dengan latar belakang relatif jernih. Reaksi dihentikan dengan menggunakan larutan fiksasi [15].

Produksi Urease

Bakteri yang digunakan untuk aplikasi *biogrouting* adalah bakteri yang memiliki aktivitas enzim tertinggi diantara isolat yang lain. Isolat ditumbuhkan dalam media B4 cair 100 mL dan media urin 100 mL. Kemudian diinkubasi menggunakan Erlenmeyer 250 mL selama 5 hari diatur suhu, pH dan medium optimal (sesuai data optimasi urease).

Produk yang dihasilkan masih mengandung biomassa sel yang tidak dibutuhkan pada proses *biogrouting*. Urease dapat diaplikasikan setelah hasil fermentasi disentrifugasi dengan kecepatan 10000-12000 rpm selama 15 menit [5].

Aplikasi Urease pada Biogrouting

Aplikasi *biogrouting* dilakukan dengan menyiapkan urease pada *syringe* ukuran 5mL. Kemudian disiapkan pasir laut yang masih dalam kondisi *salin(fresh)* ke cetakan, kemudian ditimbang massa pasirnya. Pasir diberikan perlakuan menggunakan metode injeksi langsung (De Jong *et al*, 2006), dengan volume urease masing-masing 10 mL. Selanjutnya campuran pasir dan urease diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, setiap 4 jam diukur perubahan pH pasir, pembentukan mineral kalsit secara visual dan proses pematatannya. Secara kuantitatif diukur massa pasir setelah memadat [16].

C. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *General Linear Model (GLM)*. Tiap perlakuan diulang 10 kali, tiap ulangan dibuat 3 kali pengukuran. Kombinasi yang digunakan adalah variasi jenis medium (sumber B4 urea dan B4 urin), pH (4; 5; 6; 7; 8, dan 9), dan temperatur (25°C dan 29°C) saat pengukuran aktivitas urease. Grafik yang menunjukkan nilai tertinggi dipilih sebagai kondisi paling optimum.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Aktifitas dan Optimasi Urease

Uji aktifitas dan optimasi dilakukan untuk mengetahui aktifitas optimum bakteri *biogrouting* dalam menghasilkan urease. Enzim inilah yang nantinya akan diproduksi untuk diaplikasikan pada skala laboratorium.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat dengan kode P3BG43. Berdasarkan penelitian sebelumnya isolat ini merupakan koleksi dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong. Menurut [5], isolat P3BG43 ini diambil dari daerah dengan ketinggian (± 4.000 m di atas permukaan laut) yang memiliki tekanan udara rendah sehingga suhu lingkungan juga rendah. Oleh karena itu bakteri ini sulit ditumbuhkan di daerah tropis. Bakteri ini cukup sensitif terhadap perubahan lingkungan, suhu dan medium. Hal ini ditunjukkan dengan banyaknya pengulangan yang dilakukan untuk mengadaptasikan agar

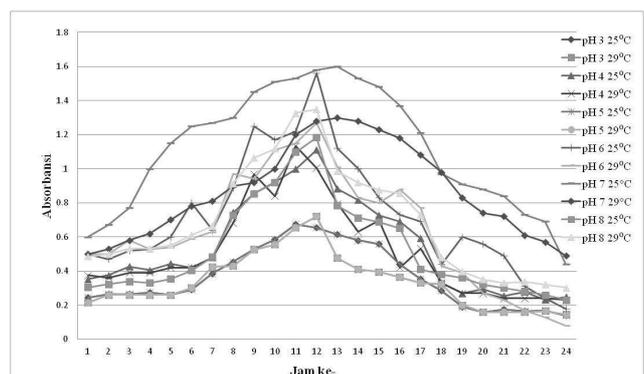
isolat dapat tumbuh. Perlu 4-5 kali kultivasi menggunakan medium NB, B4 (*marine agar*), dan NA.

Berdasarkan penelitian sebelumnya isolat P3BG43 diidentifikasi sebagai *Oceanobacillus* sp, dengan karakteristik fenotipik antara lain berbentuk batang-lurus (berukuran $0.3-2.2 \times 1.2-7.0 \mu\text{m}$), bersifat motil dengan flagella tipe lateral, membentuk endospora resisten panas (dengan jumlah tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangia) serta memberikan reaksi positif pada *urease test*. *Oceanobacillus* sp. tidak memiliki aktifitas enzim ekstraseluler ketika uji hidrolisis pati, *trybutirin* dan kasein. Isolat P3BG43 dipilih karena diketahui memiliki aktifitas urease paling tinggi berdasarkan metode Weatherburn (1967) yang dimodifikasi (Gambar 1) [5].

Optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam medium B4 dan B4 yang termodifikasi menggunakan urin (B4 urin). Kemudian diukur kepadatan selnya menggunakan spektrofotometer. Medium B4 merupakan medium yang kandungan nutrisinya berisi mineral dan urea. Urea ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) mengandung ammonium yang menyebabkan presipitasi kalsit [17]. Sedangkan medium B4 yang sumber ureanya diganti dengan urin (B4 urin) mengandung ammonia (NH_3) [18]. Kandungan amonia pada urin menyebabkan reaksi tidak sempurna untuk mempresipitasi karbonat. Keberadaan amonia dalam medium yang mengandung air (aquades) menyebabkan terjadinya reaksi spontan. Reaksi spontan yang terjadi akibat adanya air (H_2O) mengkonversi amonia (NH_3) menjadi ammonium (NH_4^+) dan karbondioksida (CO_2) akan menyeimbangkan reaksi kimia menjadi asam karbonat, ion bikarbonat dan ion karbonat. Kenaikan pH disebabkan karena ion hidroksil yang terbentuk dari produksi NH_4^+ yang melebihi ketersediaan Ca^{2+} . Kondisi ini menyebabkan lingkungan alkalin sehingga karbonat dibutuhkan untuk presipitasi kalsit.

Optimasi pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengondisikan pada 2 jenis medium, variasi pH kisaran 3-9 serta pada temperatur 25°C dan 29°C . Pengaturan kondisi medium, pH dan temperatur ini dilakukan dengan asumsi masih sesuai pada saat produk *biogrout* diaplikasikan di lingkungan.

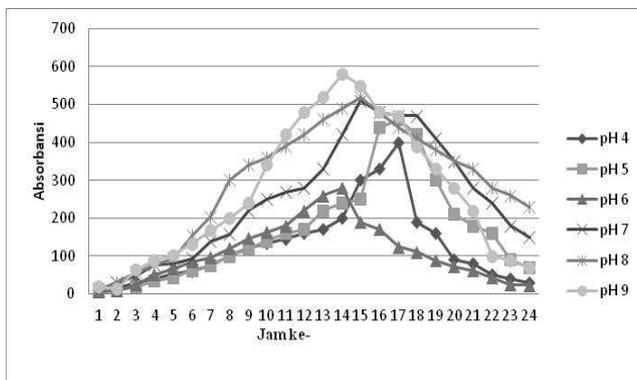
Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model* diketahui bahwa pada temperatur 25°C dan pH 7 merupakan kondisi optimum pertumbuhan bakteri *biogrouting* (Gambar 2). Diketahui *P value* kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) (tolak H_0 terima H_1) yang berarti pH dan temperatur berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *biogrout*.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Bakteri pada pH 3-8 dan temperatur 25°C dan 29°C pada Medium B4 Urea.

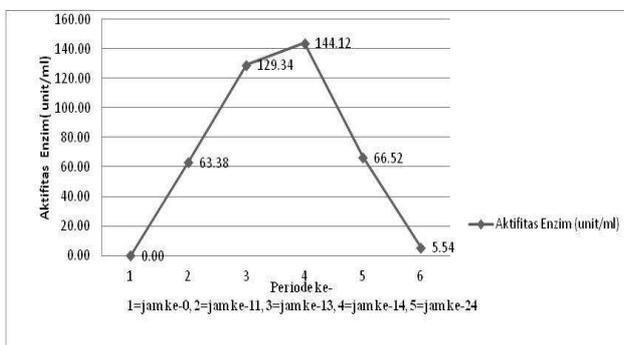
Sedangkan uji optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* pada medium urin menunjukkan hasil yang kurang signifikan. Perlakuan dilakukan hingga 10x pengulangan. Hal tersebut dimungkinkan karena beberapa faktor diantaranya kisaran pH urin dan kadar amonia yang tidak terukur. Menurut Shafiee *et al* (2003) urin lebih banyak mengandung garam sisa metabolisme tubuh dan sedikit ammonia [19]. Berdasarkan uji, diketahui bakteri *biogrout* dapat tumbuh optimal pada medium B4 urin pH 8 dan temperatur 25°C

Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model*, pertumbuhan bakteri pada B4 urin (Gambar 3) menunjukkan *p value* lebih kecil dari 0.05 ($p < 0.05$, α (alfa) 5%). Angka tersebut menunjukkan bahwa urin yang terdapat dalam medium B4 signifikan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (terima H0 tolak H1).



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Medium B4 Urin

Aktifitas urease diukur berdasarkan kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil analisis data, diketahui waktu optimal pertumbuhan bakteri adalah pada jam ke- 12 sampai jam ke- 13. Waktu tersebut diasumsikan sebagai waktu potensial untuk menghasilkan urease paling banyak. Berdasarkan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode Bradford diketahui 144 unit/ml (Gambar 4). Sedangkan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode Weatherburn (1967) didapatkan aktifitas urease 203.32 unit/ml.



Gambar 4 Aktifitas Urease pada Kondisi Optimum

B. Isolasi dan Purifikasi Urease

Presipitasi Protein Menggunakan Amonium Sulfat

Presipitasi protein dilakukan untuk memisahkan *crude extract* yang mengandung urease dari senyawa-senyawa pengotor lain. Metode presipitasi protein menggunakan ammonium sulfat dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Protein yang dipresipitasi adalah enzim

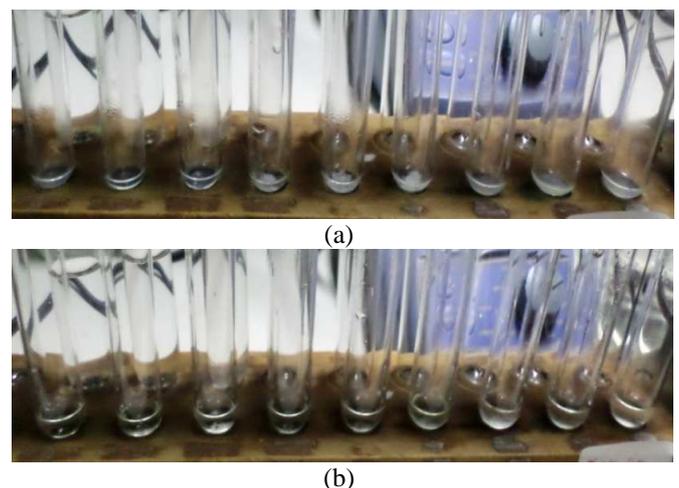
ekstrak kasar. Menurut Fujimoto *et al* (2002) protein yang akan dipresipitasi harus melalui tahap sentrifugasi karena densitas larutan jenuh bernilai rendah [20].

Berdasarkan hasil presipitasi ammonium sulfat, protein dapat terfraksinasi dalam larutan uji. Urease tidak menunjukkan pengendapan pada konsentrasi ammonium sulfat 40%. Presipitasi urease yang cukup signifikan terjadi pada konsentrasi ammonium antara 40% sampai 90% (Gambar 5). Pada konsentrasi ammonium sulfat 90% terjadi pengendapan yang paling besar, namun untuk pemisahan enzim ini lebih baik digunakan konsentrasi mulai 40%-80%. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Semakin tinggi konsentrasi garam maka kelarutan protein akan menurun [21]. Setelah didapatkan protein presipitat selanjutnya diuji menggunakan uji *Bradford*. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan *Bradford* dilakukan berdasarkan nilai absorbansi maksimum. Reagen yang digunakan adalah *Coomasie Brilliant Blue G-250* yang terikat pada protein. Kemudian larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595nm.

Pengukuran aktifitas urease dari hasil presipitasi menggunakan ammonium sulfat. Aktifitas urease paling tinggi mencapai 70.21 unit/ml dan terendah 5.36 unit/ml. Aktifitas urease dalam satuan unit/ml berarti 1 unit enzim dibutuhkan untuk membebaskan 1 $\mu\text{mol NH}_3$ dari urea per menit dalam kondisi standar [11].

Isoelektrik Point

Titik Isoelektrik merupakan kondisi tertentu dimana protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan negatif sama, sehingga tidak bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Titik isoelektrik pada enzim ekstrak kasar medium B4 urea dan B4 urin adalah pada pH 6 (Gambar 5). Hal ini ditunjukkan dengan terbentuk endapan paling banyak setelah dipanaskan.



Gambar 5. (a) *Isoelectric point* medium B4 urea (b) *Isoelectric point* medium B4 urin.

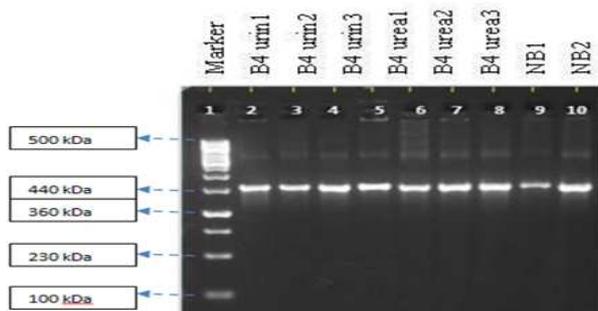
Karakterisasi Urease

Elektroforesis SDS-PAGE

Karakterisasi protein menggunakan SDS-Page bertujuan untuk mengetahui berat molekulnya (BM). Protein yang telah diberi perlakuan dengan detergen yang mengandung ion kuat seperti *sodium dodesyl sulphate* (SDS) dan agen pereduksi akan mengalami eliminasi struktur [13].

Setelah elektroforesis, protein dapat divisualisasikan dengan pewarna yang berikatan dengan protein [22].

Berdasarkan pita protein yang terlihat pada gel poliakrilamid dengan *separating gel* 7%, *stacking gel* 3%, tegangan listrik 120 volt 28 A dan elektroforegram pewarnaan gel dengan *coomassie blue* diperoleh sembilan pita protein dengan berat molekul 440-500 kDa (Gambar 6). Pita paling identik berada pada berat molekul 440 kDa. *Acrylamide* 7% pada *separating gel* digunakan untuk memisahkan protein dengan berat molekul 100-500 kDa protein. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jones and Mobley (1989) bahwa berat molekul urease adalah 440-480 kDa [23].



Gambar 6. SDS-PAGE

C. Produksi Urease

Enzim yang akan digunakan untuk aplikasi *biogrouting* adalah enzim yang memiliki aktivitas tertinggi pada fase optimasi. Berdasarkan hasil analisis, aktifitas urease paling tinggi dihasilkan oleh bakteri yang ditumbuhkan pada medium B4 urea sebesar 70.21 unit/ml, sedangkan isolat yang ditumbuhkan pada B4 urin sebesar 51.74 unit/ml. Peneliti melakukan produksi dengan menumbuhkan isolat pada 2 variasi medium B4 masing-masing 100ml medium. Berdasarkan rancangan penelitian isolat ditumbuhkan dalam medium B4 cair 1500 mL dan medium urin 1500 mL. Kemudian diinkubasi menggunakan fermentor (ukuran 5L) selama 5 hari diatur suhu, pH dan medium optimal (sesuai data optimasi urease). Fermentor yang digunakan merupakan fermentor modifikasi dari Renge *et al* (2012) [24]. Hal tersebut tidak dapat dilakukan karena terjadi kerusakan alat pada fermentor dan keterbatasan jumlah medium. Produksi dengan skala 100ml dikondisikan sesuai dengan pertumbuhan optimum bakteri (Gambar 7). Medium B4 urea, bakteri optimal tumbuh pada pH 7 temperatur 25°C sedangkan medium B4 urin optimal tumbuh pada pH 8 suhu yang sama.



Gambar 7. Produksi urease

D. Aplikasi Urease pada Biogrouting

Aplikasi *biogrouting* dilakukan dengan metode injeksi langsung (De Jong *et al*, 2006) (Gambar 8a) [25]. Sebanyak 10ml urease diinjeksikan pada 200gr pasir laut

dengan kondisi salin (Gambar 8b). Berdasarkan pengamatan parameter aplikasi, pH pasir meningkat dari pH netral (7) menjadi pH basa (11). Terjadi pembentukan mineral kalsit secara visual, dan proses pemadatan pasir. Kontrol negatif yang digunakan adalah pasir tanpa diinjeksi urease.

Berdasarkan hasil pengamatan, terjadi peningkatan pH pasir serta permukaan pasir setelah perlakuan injeksi urease mulai rata dan mengeras. Mengerasnya pasir ini disebabkan oleh adanya senyawa karbonat hasil aktifitas bakteri yang menjadi jembatan sementasi antara butiran pasir.

Terjadi perbedaan hasil antara *control* (tidak diinjeksi urease), dengan pasir yang diinjeksi dengan urease dari medium B4 urea dan B4 urin. Diduga kecepatan sementasi tersebut disebabkan oleh besar kecilnya aktifitas urease yang dihasilkan.



Gambar 8. Aplikasi *biogrouting*

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada medium B4 urea dengan pH 7 dan temperatur 25°C, sedangkan pada medium B4 urin bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada temperatur 25°C dan pH 8. Pengukuran aktifitas urease mencapai 144.12 unit/ml. Berdasarkan karakterisasi protein menggunakan ammonium sulfat protein mengendap maksimal pada konsentrasi 90% (70.21 unit/ml). Diketahui titik isoelektrik urease adalah pada pH 6 dan memiliki berat molekul 440-500 kDa. Urease dapat dijadikan material *grout* karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi (*diagenesis*) pada aplikasi sederhana *biogrouting* menggunakan pasir laut dengan kondisi salin.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Van Paassen, L. "Microbes Build Underground Constructions". Natural Resources, Jaargang 11 - Nummer 2 p. 10-14, TU Delft, Netherland (2008).
- [2] Karol, R.H. *Chemical Grouting and Soil Stabilization*. International Journal NewYork, NY (2003) pp. 558.
- [3] Xanthakos, P.P., Abramson, L.W., Bruce, D.A. *Ground Control and Improvement*. Review. John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 910 (1994).
- [4] Hammes, F., and W. Verstraete. *Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation*. Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology (2002) 1: 3-7.
- [5] Lisdiyanti P. "Bacterial carbonate precipitation for biogrouting". Prosiding Simposium Nasional Ekohidrologi (2011) PP 219-232.
- [6] Hammes, F., N. Boon, J. De Villiers, S. D. Siciliano, and W. Verstraete. *Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation*. Applied and Environmental Microbiology Journal (2003b) 69: 4901-4909
- [7] Fujita Y, Ferris FG, Lawson RD, Colwell FS, Smith RW. *Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria*. Geomicrobiol Journal (2000) 17:305- 318.
- [8] Mobley, H. L. T., and R. P. Hausinger. 1989. "Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization". Microbiological. Reviews. 53: 85-108 (1989).

- [9] Chu Jian, V and Ivanov. *Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ*. Rev Environ Sci Biotechnol (2008) 7:139–153.
- [10] Wijngaarden V K.W M. “*Modelling Biogrout: a new ground improvement method based on microbial induced carbonate precipitation*”. ISSN 1389-6520 Reports of the Delft Institute of Applied Mathematics Delft (2009).
- [11] Keykha A.H, Bujang B.K, Afshin Asadi and Satoru Kawasaki. “*Electro-Biogrouting and Its Challenges. Paper*”. Department of Civil Engineering, University Putra Malaysia and Hokaido University (2012).
- [12] Burgess, Thomson, Anthony C. Grabskil and Richard R. “*Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips1*”. Applied Microbiology and Biotechnology (2002) 62: 191-201
- [13] Weaver IC. “*Early Environmental Regulation of Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Expression*”. International Publishing. Ann NY Acad Sci 1024:182-212 (2005).
- [14] Bang,S.S., Johnna K. Galinat, dan V. Ramakrishnan. “*Calcite Precipitation induced by Polyurethane-Immobilized Bacillus pasteurii*”. Enzyme and Microbial Technology Journal 28 (2001) 404 – 409.
- [15] Baskar, S., R. Baskar, L. Mauclair, and J. A. McKenzie. “*Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves*”. Dehradun, India, Current Science, 90(1) (2006) 58-64.
- [16] Harkes, M.P. *Microbial Induced Carbonate Precipitation as Ground Improvement Method – Bacterial Fixation and Empirical Correlation CaCO₃ vs Strength*. Proceeding of The 1st International Conference Bio Geo Civil Engineering. Netherlands (2008).
- [17] Ramakrishnan, V., Santosh, K.R., Duke, E.F., and Bang, S.S. “*SEM Investigation of Microbial Calcite Precipitation in Cement*”, Proceedings of the 22nd International Conference on Cement Microscopy, April, Montreal, Quebec, Canada (2000).
- [18] Lee, T.S. “*Computations in the early visual cortex*”. J. Physiology (Paris) (2003) 97(203), 121-139.
- [19] Shafiee M, Carbonneau MA, Urban N, Descomps B & Léger CL. “*Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production*”. A comparison to other extracts or compounds. Journal Science Free Radic. Res.37: 573–584 (2003).
- [20] Fujimoto, C. *Titanium dioxide coated surfaces for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*. Electrophoresis Journal (2002) 23(17), 2929-2937.
- [21] S. Englard and S. Seifter. *Methods Enz Journal*. (1990) 182:285-300.
- [22] Burden D W and D B Whitney. *Biotechnology: Proteins to PCR Book*. by. pp 336. Birkhfiuser, Basel. (1995).
- [23] Mobley, H. L. T., M. D. Island, and R. P. Hausinger. “*Molecular Biology of Microbial Ureases*”. Microbiological Reviews. 59: 451-480 (1995).
- [24] Renge V.C, Khedkar.V, and Nikita R. Nandukar. “*Enzym Synthesis By Fermentation Method*”. A Review. Department of Chemical Engineering, College of Engineering and Technology, NH, India. No.6 (2012).
- [25] De Jong, Jason T., Fritzges, Michael B., and Nusslein, Klaus. *Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear*. Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering. American Society of Civil Engineers (2006).