

## **Biogrouting: Produksi Urease dari Bakteri Laut (*Oceanobacillus* sp.) Pengendap Karbonat**

**Biogrouting: Urease Production from Carbonat Presipitation Bacteria (*Oceanobacillus* sp.)**

**Sidratu Ainiyah<sup>1\*</sup>, Puspita Lisdiyanti<sup>2</sup>, Maharani Pertiwi<sup>2</sup>, dan Endry Nugroho Prasetyo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Jln. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jln. Raya Jakarta Bogor Km. 46 Cibinong Bogor

Email: sidratu.marinebiology@gmail.com \*Penulis Korespondensi

### **Abstract**

Grouting is the process of pore filling with grout material (construction material). Biogrouting is a technology that simulates the process of diagenesis, namely the transformation of sandgrain into sandstone (calcarinite). Calcite ( $\text{CaCO}_3$ ) formed from biogrouting process. The research problem is how to optimize the product with the urease activity test, isolation, purification, characterization of urease and applying it as a grout material. Optimization activities test carried out by growing isolates *Oceanobacillus* sp. in two variation of mediums (urea and B4 urine), five variations of pH (4–8) and two variations of temperature (25°C and 29°C). Then, the optimal isolates were purified using ammonium sulfate and identified with isoelectric point. The product of protein precipitates were characterized using SDS-PAGE. Based on the research results revealed that the highest urease activity was 203.32 units / ml. Optimal urease produced in isolates grown in medium B4 urine at pH 8 (25°C), while in medium B4 urea at pH 7 (25°C). The molecular weight of urease characterized using SDS-PAGE was 440 kDa, and the isoelectric point at pH 6. Urease can be used as grouting material because it gives a positive response to simple application biogrouting cementation.

**Keywords:** biogrouting, diagenesis, *Oceanobacillus* sp., urease

### **Abstrak**

Biogrouting adalah teknologi yang mensimulasi proses diagenesis yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir (*calcarinite/sandstone*). Permasalahan penelitian ini bagaimana mengoptimasi produk *urease* dengan melakukan uji aktifitas, mengisolasi, mempurifikasi dan mengkarakterisasi serta mengaplikasikannya sebagai material *grout*. Uji aktifitas dan optimasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Oceanobacillus* sp. pada dua variasi medium (B4 urea dan B4 urin), lima variasi pH (4-8) dan dua variasi suhu (25°C dan 29°C). Hasil uji aktifitas dan optimasi selanjutnya dipurifikasi menggunakan ammonium sulfat dan dicari titik isoelektriknya. Kemudian hasil protein presipitat dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa aktifitas urease paling tinggi adalah 203,32 unit/ml. Urease optimal dihasilkan pada isolat yang ditumbuhkan pada B4 urea pada pH 7 suhu 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

Diterima: 21 September 2015, disetujui: 26 November 2015

## **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 (Van Paasen, 2008). Proses pengisian material konstruksi pada pori dan celah diantara partikel tanah dengan kedalaman tertentu dikenal sebagai *grouting* (Van Paasen, 2008). *Grouting* digunakan untuk memperbaiki struktur tanah karena pengendapan

*grout* dapat mengubah karakter fisik tanah (porositas, permeabilitas dsj.). Sampai saat ini *grouting* untuk tujuan rancang bangun dilakukan secara kimia menggunakan presipitasi silika (*waterglass*) (Van Paasen, 2008). 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 (Hammes dkk., 2002).

Di Indonesia metode *grouting* secara biologi (*biogrouting*) mulai dikembangkan lima tahun terakhir (Lisdiyanti, 2011). *Biogrouting* merupakan teknologi yang mensimulasikan proses diagenesis, yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir. Secara alami, proses ini memerlukan waktu hingga jutaan tahun. Menurut Van Paasen (2008) proses diagenesis tersebut dapat dipercepat menggunakan bakteri penghasil urease.

Aplikasi bakteri laut sebagai material *grout* telah banyak dilakukan (Lisdiyanti, 2011). Keterbatasan faktor abiotik, seperti pH dan suhu menyebabkan kurang optimalnya proses *biogrouting*. Penelitian yang dilakukan Keikha dkk., (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.

Kaltwasser (1972) dan Ramakhrisan dkk., (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 (Fujita dkk., 200) (Moblely dkk., 1989). Dalam penelitian ini dilakukan produksi melalui pengukuran titik isoelektrik, purifikasi menggunakan ammonium sulfat dan karakterisasi dengan SDS-PAGE, serta aplikasinya dalam proses *biogrouting*.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada medium B4 urea dengan pH 7 dan suhu 25°C, sedangkan pada medium B4 urin bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada suhu 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% (203,32 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 (Lisdiyanti, 2011).

## Metode Penelitian

### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan mulai Januari sampai Juni 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Intitut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, dan Laboratorium Penyakit Tropis (TDC/ *Tropical Disease Center*) Universitas Airlangga. Kemudian penelitian lanjut dilakukan dari bulan Januari sampai Juli 2015 di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong, Bogor.

### 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, yaitu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> digunakan dalam larutan alkalin hipoklorit dibandingkan dengan NaOH. Reaksi dilakukan dalam tabung reaksi yang berisi 100 µl sampel, 500 µl urea 50 mM dan 500 µl buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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. Kemudian larutan alkalin hipoklorit sebanyak 1000 µl ditambahkan ke dalam tabung dan diinkubasi pada suhu ruang 25°C selama 30 menit. Selanjutnya diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer

pada panjang gelombang 630 nm dan dibandingkan dengan kurva standar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Satu unit enzim berarti jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_3$  dari urea per menit dalam kondisi standar (Wijngaarden, 2009).

### Isolasi dan Purifikasi Urease

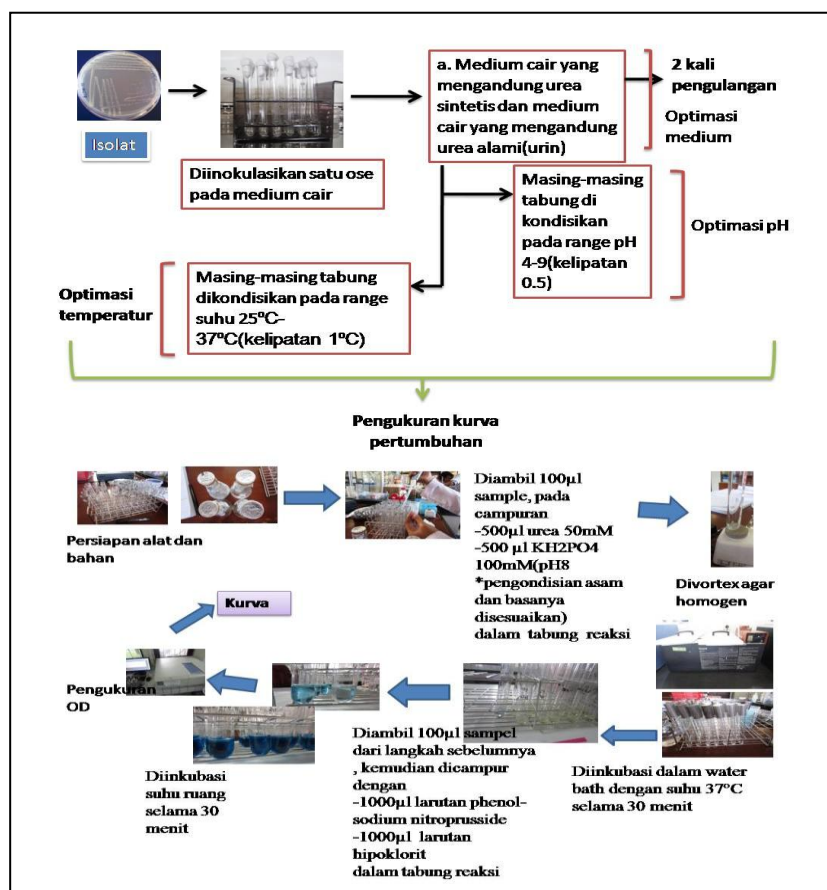
#### Metode Presipitasi Protein Menggunakan Amonium Sulfat

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 disuspensikan dengan *buffer* salin fosfat hingga didapat protein *presipitat* sebanyak 10 ml. Protein *presipitat* yang dihasilkan kemudian ditentukan konsentrasinya dengan metode Bradford (Keykha dkk., 2012).

#### Metode Isoelektrik Point

Titik isoelektrik merupakan daerah tertentu yang 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 (Burgess dkk., 2002).

Pertama disiapkan 9 tabung reaksi bersih dan kering, lalu dimasukkan 3 ml *urease* pada tiap-tiap tabung. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan *buffer* asetat masing-masing pada 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. Setelah itu diamati hasilnya. Pembentukan endapan dan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Weaver, 2005).



Gambar 1. Optimasi dan uji aktivitas urease menggunakan kurva standart.

### Karakterisasi Urease Elektroforesis SDS-PAGE

Karakterisasi protein menggunakan SDS-Page bertujuan mengetahui berat molekulnya (BM). Protein yang telah diberi perlakuan detergen yang mengandung ion kuat seperti *sodium dodesyl sulphate* (SDS) dan pereduksi akan mengalami eliminasi struktur. Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode Edelman dan Bollag (1991) dalam Baskar dkk., 2006. 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*, kemudian dilakukan *loading* sampel ke dalam sumur sebanyak 12 µl. Berbeda 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 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O) selama 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan akua bides selama 3 x 20 menit. Setelah itu, gel direndam dalam larutan *staining* silver nitrat (larutan AgNO<sub>3</sub> + formaldehida 37%) selama 30 menit lalu dibilas cepat dengan akua bides selama 2 x 20 detik. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan *destaining* (larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + formaldehida 37%) sampai diperoleh pita-pita protein yang jelas teramati dengan latar belakang relatif

jernih. Reaksi dihentikan menggunakan larutan fiksasi (Baskar, 2006).

### Produksi Urease

Bakteri yang digunakan untuk aplikasi *biogrouting* adalah bakteri yang memiliki aktivitas enzim tertinggi diantara isolat yang lain. Isolat ditumbuhkan dalam medium B4 cair 100 mL dan medium 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 (Lisdiyanti, 2011).

### 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 dkk., 2006), dengan volume urease masing-masing 10 mL. Selanjutnya campuran pasir dan urease diinkubasi pada suhu ruang 25°C 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.

### Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah *General Linear Model (GLM)* (Lisdiyanti, 2011). 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 suhu (25°C dan 29°C) saat pengukuran aktivitas urease. Grafik yang menunjukkan nilai tertinggi dipilih sebagai kondisi paling optimum.

## Hasil dan Pembahasan

### 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 Lisdiyanti (2011), isolat P3BG43 ini diambil dari daerah dengan ketinggian  $\pm 4.000$  m di atas permukaan laut yang memiliki tekanan udara rendah sehingga suhu lingkungan juga rendah. Oleh karena itu, bakteri ini sulit ditumbuhkan di daerah dataran rendah (pesisir). 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 (jumlah tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangium) 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) (Lisdiyanti, 2011).

Optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam medium B4 dan B4 yang termodifikasi menggunakan urin (B4 urin). Kemudian diukur kepadatan selnya dengan 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. Sedangkan medium B4 yang sumber ureanya diganti dengan urin (B4 urin) mengandung ammonia ( $\text{NH}_3$ ). 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 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) mengkonversi amonia ( $\text{NH}_3$ ) menjadi ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dan karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ) akan menyeimbangkan reaksi kimia menjadi asam karbonat, ion bikarbonat dan ion karbonat (Ramakrishnan dkk., 2000). Kenaikan pH disebabkan karena ion hidroksil yang terbentuk dari produksi  $\text{NH}_4^+$  yang melebihi ketersediaan  $\text{Ca}^{2+}$ . Kondisi ini menyebabkan lingkungan alkalin sehingga karbonat dibutuhkan untuk presipitasi kalsit (Lee, 2003).

Optimasi pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengondisikan pada 2 jenis medium, variasi pH kisaran 3–9 serta pada suhu  $25^\circ\text{C}$  dan  $29^\circ\text{C}$ . Pengaturan kondisi medium, pH dan suhu ini dilakukan dengan asumsi masih sesuai pada saat produk *biogrout* diaplikasikan di lingkungan.

Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model* diketahui bahwa pada suhu  $25^\circ\text{C}$  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 suhu berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *biogrout*.

Uji optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* pada medium urin menunjukkan hasil yang kurang signifikan. Perlakuan dilakukan hingga 10x pengulangan. Hal tersebut karena beberapa faktor diantaranya kisaran pH urin dan kadar amonia yang tidak terukur. Menurut Shafiee dkk., (2003) urin lebih banyak mengandung garam sisa metabolisme tubuh dan sedikit ammonia. Berdasarkan uji, diketahui bakteri *biogrout* dapat tumbuh optimal pada medium B4 urin pH 8 dan suhu  $25^\circ\text{C}$ .

Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model*, pertumbuhan bakteri pada B4 urin (Gambar 3) menunjukkan *P value* lebih kecil dari 0,05 ( $p < 0,05$ ,  $\alpha 5\%$ ). Angka tersebut menunjukkan bahwa urin yang terdapat dalam medium B4 signifikan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (terima  $H_0$  tolak  $H_1$ ).

Aktifitas *urease* diukur berdasarkan kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil analisis data, diketahui waktu optimal pertumbuhan bakteri adalah pada jam ke-12 sampai ke-13. Waktu tersebut diasumsikan

sebagai waktu potensial untuk menghasilkan urease paling banyak. Berdasarkan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode Bradford diketahui 144 unit/ml.

### **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 dkk., (2002) protein yang akan dipresipitasi harus melalui tahap sentrifugasi karena densitas larutan jenuh bernilai rendah (Fujimoto dkk., 2002). 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 4). 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 (Englard dan Seifter, 1990). Setelah didapatkan protein presipitat selanjutnya diuji menggunakan uji *Bradford*. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan *Bradford* dilakukan berdasarkan nilai absorbansi maksimum. Reagen yang digunakan adalah *Coomassie Brilliant Blue G-250* yang terikat pada protein. Kemudian larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm.

Pengukuran aktifitas urease dari hasil presipitasi menggunakan ammonium sulfat mencapai 203,32 unit/ml. Aktifitas urease dalam satuan unit/ml berarti 1 unit enzim dibutuhkan untuk membebaskan 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_3$  dari urea per menit dalam kondisi standar.

#### **Isoelektrik Point**

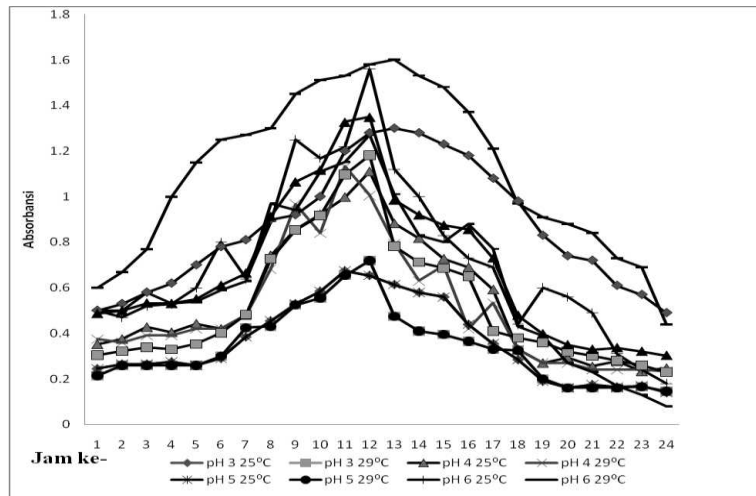
Titik Isoelektrik merupakan kondisi tertentu ketika protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan negatif sama, sehingga tidak bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Titik isoelektrik pada enzim ekstrak kasar medium B4 urea dan B4 urin adalah pada pH 6 (Gambar 4). Hal ini ditunjukkan dengan terbentuk endapan paling banyak setelah dipanaskan.

#### **Karakterisasi Urease**

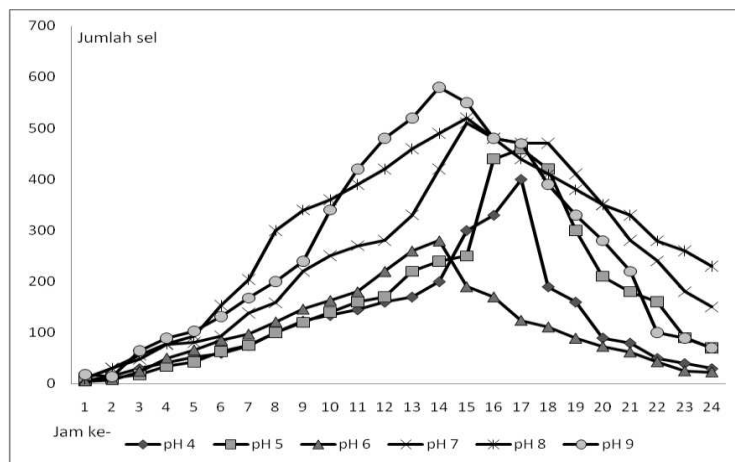
##### **Elektroforesis SDS-PAGE**

Karakterisasi protein menggunakan SDS-Page bertujuan mengetahui berat molekulnya (BM). Protein yang telah diberi perlakuan detergen yang mengandung ion kuat seperti *sodium dodesyl sulphate* (SDS) dan agen pereduksi akan mengalami eliminasi struktur (Weaver, 2005). Setelah elektroforesis, protein dapat divisualisasikan dengan pewarna yang berikatan dengan protein (Burden dan Whitney, 1995).

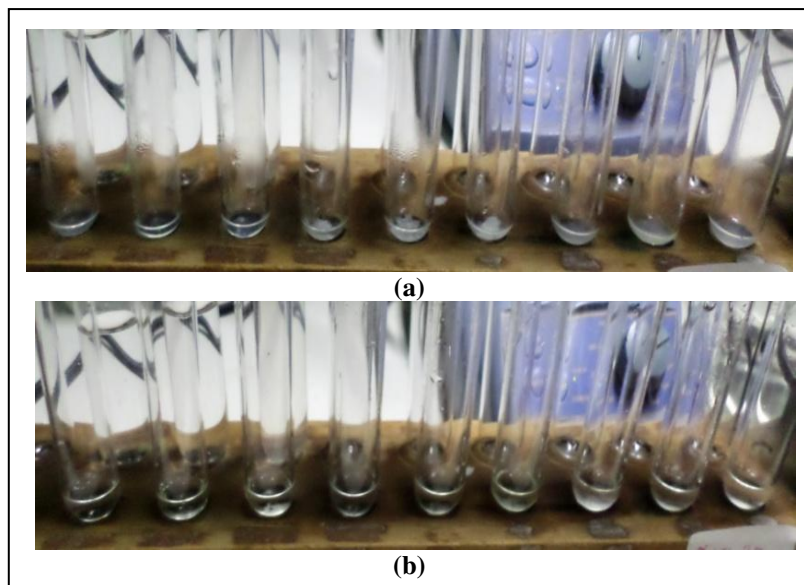
Berdasarkan pita protein yang terlihat pada gel poliakrilamid dengan *separating gel* 7%, *stacking gel* 3%, tegangan listrik 120 volt 28 A dan elektroforegram pewarnaan gel dengan *coomasie blue* diperoleh sembilan pita protein dengan berat molekul 440-500 kDa. Pita paling identik berada pada berat molekul 440 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jones and Mobley (1989) bahwa berat molekul urease adalah 440-480 kDa (Mobley dkk., 1995).



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan bakteri pada pH 3-8 dan suhu 25°C dan 29°C pada medium B4 urea.



**Gambar 3.** Kurva pertumbuhan bakteri pada medium B4 urin.



**Gambar 4.** (a) Isoelectric point medium B4 urea (b) Isoelectric point medium B4 urin.

### Produksi Urease

Enzim yang 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 203,32 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 dkk., (2012). Hal tersebut tidak dapat dilakukan karena terjadi kerusakan alat pada fermentor dan keterbatasan jumlah medium. Sehingga produksi dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada volume medium 100ml. Selanjutnya dikondisikan sesuai dengan pertumbuhan optimum bakteri (Gambar 5). Medium B4 urea, bakteri optimal tumbuh pada pH 7 suhu 25°C sedangkan medium B4 urin optimal tumbuh pada pH 8 suhu yang sama.

### Aplikasi Urease pada Biogrouting

Aplikasi *biogrouting* dilakukan dengan metode injeksi langsung (Gambar 6a) (De Jong dkk., 2006). Sebanyak 10ml urease diinjeksikan pada 200gr pasir laut dengan kondisi salin (Gambar 6b). Berdasarkan pengamatan parameter aplikasi, pH pasir meningkat dari pH netral (Hammes dkk., 2003b) menjadi pH basa (Keikha dkk., 2012). Terjadi pembentukan mineral kalsit secara visual, dan proses pematatan 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 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. Kecepatan sementasi tersebut disebabkan oleh besar kecilnya aktifitas urease yang dihasilkan.



Gambar 5. Produksi urease.



Gambar 6. Aplikasi biogrouting.



## Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada medium B4 urea dengan pH 7 dan suhu 25°C, sedangkan pada medium B4 urin bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada suhu 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% (203,32 unit/ml). Diketahui titik isoelektrik urease adalah pada pH 6 dan memiliki berat molekul 440kDa. Urease dapat dijadikan material *grout* karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi (diagenesis) pada aplikasi sederhana *biogrouting* menggunakan pasir laut dengan kondisi salin.

## Daftar Pustaka

- Bang, S.S., Johnna, K., Galinat dan Ramakrishnan, V. 2001. *Calcite Precipitation induced by Polyurethane-Immobilized Bacillus pasteurii*. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, 28: 404 – 409.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclair, L. dan McKenzie, J.A. 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves. Dehradun, India, *Current Science*, 90 (1): 58-64.
- Burgess, Thomson, Anthony, C., Grabski dan Richard, R. 2002. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 191–201.
- Chu Jian, V. dan Ivanov. 2008. Applications of microorganisms to geotechnical engineering for bioclogging and biocementation of soil in situ. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 7: 139–153.
- De Jong, Jason, T., Fritzes, Michael, B. dan Nusslein, K. 2006. Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 132 (11): 1381–1392.
- Fujimoto, C. 2002. Titanium dioxide coated surfaces for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Electrophoresis Journal*, 23 (17): 2929–2937.
- Fujita, Y., Ferris, F.G., Lawson, R.D., Colwell, F.S. dan Smith, R.W. 2000. Calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria. *Geomicrobiol Journal*, 17: 305–318.
- Hammes, F. dan Verstraete, W. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, 1: 3–7.
- Hammes, F., Boon, N., De Villiers J., Siciliano, S.D. dan Verstraete, W. 2003b. Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 69: 4901–4909.
- Harkes, M.P. 2008. Microbial Induced Carbonate Precipitation as Ground Improvement Method – Bacterial Fixation and Empirical Correlation CaCO<sub>3</sub> vs Strength. *Proceeding of The 1<sup>st</sup> International Conference Bio Geo Civil Engineering*. Netherlands.
- Karol, R.H. 2003. *Chemical Grouting and Soil Stabilization*. International Journal NewYork, NY. pp. 558.
- Keykha, A.H., Bujang, B.K., Afshin, A. dan Satoru, K. 2012. *Electro-Biogrouting and Its Challenges*. Paper. Department of Civil Engineering, University Putra Malaysia and Hokaido University.
- Lee, T.S. 2003. Computations in the early visual cortex. *J. Physiology*, 97 (203): 121–139.
- Lisdiyanti, P. 2011. Bacterial carbonate precipitation for biogrouting. *Prosiding Simposium Nasional Ekohidrologi*, PP 219–232.
- Mobley, H.L.T. dan Hausinger, R.P. 1989. Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiological*, 53: 85–108.
- Mobley, H.L.T., Island, M.D. dan Hausinger, R.P. 1995. Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*, 59: 451–480.
- Ramakrishnan, V., Santosh, K.R., Duke, E.F. dan Bang, S.S. 2000. SEM Investigation of Microbial Calcite Precipitation in Cement, Proceedings of the 22nd International Conference on Cement Microscopy, April, Montreal, Quebec, Canada.
- Renge, V.C., Khedkar, V. dan Nikita, R.N. 2012. *Enzym Synthesis By Fermentation Method*. A Review. Department of Chemical Engineering, College of Engineering and Technology, NH, India. No. 6.
- Englard, S. dan Seifter, S. 1990. Precipitation Techniques Method in enzymology : Guide to Protein Purification. *Methods Enz Journal*, 182: 285–300.

*Produksi Urease dari Bakteri Laut (Oceanobacillus sp.) Pengendap Karbonat*

- Burden, D.W. dan Whitney, D.B. 1995. *Biotechnology: Proteins to PCR Book*. by. pp 336. Birkhfiuser, Basel.
- Shafiee, M., Carbonneau, M.A., Urban, N., Descomps, B. dan Léger, C.L. 2003. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu<sup>2+</sup>, 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.
- Van Paassen, L. 2008. Microbes Build Underground Constructions. *Natural Resources, Jaargang 11 - Nummer 2 p. 10-14, TU Delft, Netherland.*
- Weaver, I.C. 2005. Early Environmental Regulation of Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Expression. International Publishing. *Ann NY Acad Sci.*, 1024: 182–212.
- Wijngaarden, V.K.W.M. 2009. *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.
- Xanthakos, P.P., Abramson, L.W. dan Bruce, D.A. 1994. *Ground Control and Improvement*. Review. John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 910.