

Aktivitas Urease dan Pembentukan Kalsium Karbonat oleh Bakteri Ureolitik

Urease Activity and Calcium Carbonate Formation by Ureolytic Bacteria

Tetty Marta Linda^{1*}, Mufidah Dwi Suci Ningsih¹, Bernadeta Leni Fibriarti¹,
Saras Andini¹, Dedi Futra²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau

²Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Kejuruan dan Ilmu Pengetahuan Universitas Riau

*email: tetty.martalinda@gmail.com

Abstrak. Bakteri ureolitik adalah bakteri yang memiliki aktivitas enzim urease yang menghidrolisis urea untuk menghasilkan karbondioksida dan amonia. Bakteri ini dapat diaplikasikan untuk agrikultur, kesehatan dan konstruksi. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan aktivitas urease *Bacillus* SP 34 dan *Bacillus* SP 83 dan kemampuannya menghasilkan kalsium karbonat. Pengujian aktivitas urease secara kuantitatif dilakukan dalam *Nutrient Broth* selama 18 jam. Produksi kalsit menggunakan medium NB-U/Ca inkubasi selama 7 hari. Hasil penelitian diketahui *Bacillus* SP 34 aktivitas urease yaitu 0,058 U/ml dan kalsium karbonat terbentuk 169.0 mg dan *Bacillus* SP 83 dengan aktivitas urease 0.065 U/ml dan kalsium karbonat terbentuk 105.0 g. Ke dua isolat ini dapat dikembangkan untuk bidang pertanian dan konstruksi sebagai bahan campuran beton.

Kata kunci: *Bacillus*, urease, kalsium karbonat

Abstract. Ureolytic bacteria are bacteria that have urease enzyme activity which hydrolyzes urea to produce carbon dioxide and ammonia. These bacteria can be applied for agriculture, health and construction. This study aims to determine the urease activity of *Bacillus* SP 34, and *Bacillus* SP 83 and its ability to produce calcium carbonate. Quantitative urease activity testing was carried out in *Nutrient Broth* for 18 hours. Calcite production used NB-U/Ca medium incubation for 7 days. The results showed that *Bacillus* SP 34 urease activity was 0.058 U/ml and calcium carbonate formed 169.0 mg and *Bacillus* SP 83 with urease activity 0.065 U/ml and calcium carbonate was formed 105.0 g. These two isolates can be developed for agriculture and construction as a mixture of concrete.

Key words: *Bacillus*, urease, calcium carbonate

PENDAHULUAN

Urease merupakan enzim yang terkandung di dalam bakteri ureolitik yang mampu menghidrolisis urea menghasilkan amonia dan karbondioksida (Burbank *et al.* 2012). Bakteri ureolitik telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti bidang pertanian digunakan sebagai bahan dalam pembuatan biofertilizer karena adanya kandungan nitrogen (Glibert *et al.* 2006). Bakteri urease juga berperan dalam mengkatalisis proses biomineralisasi yang dikenal dengan presipitasi kalsit dapat digunakan dalam bidang konstruksi (Krishnapriya and Venkatesh 2015).

Aktivitas enzim urease ditandai dengan adanya amonia yang terbentuk, dan amonia yang dihasilkan dapat diukur menggunakan metode spektrofotometri (Phang *et al.* 2018). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bakteri ureolitik dalam menghasilkan enzim urease mampu mengkonversi urea menghasilkan amonia diantaranya isolat bakteri TSB12 yang diisolasi dari gua batu kapur memiliki aktivitas urease sebesar $8,7 \times 10^6$ μmol amonia/menit (Omorieg *et al.* 2016). Krishnapriya and Venkatesh (2015) melaporkan bakteri ureolitik BI 1, BI 2 dan BI 5 menghasilkan kalsit berturut-turut sebanyak 0,84 g; 0,82 g dan 0,76 g. Pengujian isolat bakteri BI 5 dengan campuran beton menghasilkan kuat tekan beton sebesar 38,30 Mpa. Ningsih *et al.* (2018) telah menguji bakteri ureolitik Gram positif yaitu isolat SP 9, SP 20 dan SP 32 yang masing-masingnya mampu menghasilkan kalsit sebanyak 0,126 g, 0,105 g dan 0,129 g.

Hidrolisis urea oleh enzim urease dalam mikroorganisme heterotrofik akan menghasilkan ion karbonat dan ammonium. Presipitasi kalsit (CaCO_3) dapat dihasilkan oleh organisme heterotrofik. Organisme ini menghasilkan karbonat atau bikarbonat. Presipitasi kalsium karbonat (CaCO_3) merupakan fenomena yang dijumpai di alam seperti air laut, air dan tanah (Hammes dan Verstraete

2002). Presipitasi ini dipengaruhi oleh faktor: (i) konsentrasi kalsium (Ca^{2+}), (ii) konsentrasi karbon anorganik terlarut, (iii) pH dan (iv) ketersediaan situs nukleasi. Peran utama mikroorganisme dalam presipitasi karbonat adalah karena kemampuan mereka menciptakan lingkungan yang basa melalui berbagai kegiatan fisiologis mereka (Castanier *et al.* 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan aktivitas enzim urease dan produksi kalsium karbonat yang dihasilkan dari isolat bakteri *Bacillus* kelompok ureolitik.

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mesin sentrifus, spektrofotometer, *laminar air flow cabinet*, *shaker incubator*, autoklaf, timbangan digital, microwave, *hotplate*, vortek, *vacuum filter*, mikropipet erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, bunsen, jarum ose, rak tabung reaksi, *sprayer*, gelas ukur, gelas kimia, labu ukur, batang pengaduk, kuvet, aluminium foil,

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah dua isolat bakteri ureolitik yaitu *Bacillus* SP 34 dan *Bacillus* SP 83, medium *Nutrient Agar* (NA), medium NB (*Nutrien Broth*), reagen *Nessler*, urea, NaCl, alcohol, aquades, bubuk Tris HCl, HCl 1 N.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau. Penelitian ini dibagi menjadi empat tahapan yakni, sterilisasi, pembuatan media dan larutan; peremajaan bakteri, pengujian aktivitas urease dan pengujian produksi kalsium karbonat.

Tahap pertama adalah persiapan mensterilkan alat-alat gelas dan bahan-bahan di dalam autoklaf pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya pembuatan media NA dan NB dan NB-U/Ca. Medium NB-U/Ca digunakan untuk melihat presipitasi kalsium karbonat (CaCO_3) oleh bakteri. Sebanyak 3 g *nutrien broth*, 28,5 g kalsium klorida dilarutkan ke dalam 900 ml aquades dan dilakukan sterilisasi. Selanjutnya dilakukan penambahan 20 g urea yang sebelumnya telah dilarutkan dalam 100 ml aquades dan disterilisasi menggunakan filter (Krishnapriya and Venkatesh 2015).

Tahap kedua adalah peremajaan bakteri. Bakteri *Bacillus* SP 34 dan *Bacillus* SP 83 yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil penelitian sebelumnya oleh Ningsih *et al.* (2018). Bakteri ini hasil isolasi dari sampel tanah tempat pembuangan akhir sampah yang telah diketahui kemampuan ureolitik secara kualitatif. Peremajaan bakteri dilakukan dengan satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium NA miring dengan metode *streak*, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya disimpan pada 4°C untuk digunakan pada tahap berikutnya.

Tahap ketiga adalah pengujian aktivitas enzim urease. Isolat bakteri ureolitik *Bacillus* SP 34 dan *Bacillus* SP 83 sebanyak satu ose diinokulasikan ke dalam 150 ml NB kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 140 rpm pada suhu 30°C selama 18 jam. Kemudian masing-masing isolat dilakukan pengenceran berseri dan *Total Plate Count* (TPC) untuk mendapatkan total populasi 10^6 CFU/ml. Masing-masing isolat bakteri selanjutnya dimasukkan sebanyak 30 ml ke dalam tabung sentrifus lalu disentrifus dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan pelet bakteri.

Pelet bakteri selanjutnya ditambahkan larutan Tris/HCl 100 mM *buffer* pH 8 sebanyak 10 ml lalu divortex dan disentrifus. Selanjutnya, pellet ditambahkan kembali larutan Tris/HCl 100 mM *buffer* pH 8 lalu divortex dan disentrifus kembali. Langkah pencucian dilakukan 3 x. Pelet selanjutnya di re-suspensi ke dalam 30 ml larutan Tris/HCl 100 mM *buffer* pH 8 yang mengandung urea 300 mM lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 jam (Phang *et al.* 2018).

Di akhir inkubasi, suspensi bakteri disentrifus untuk mendapatkan supernatan. Uji aktivitas urease dilakukan dengan cara masing-masing supernatan dari isolat diambil sebanyak 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan sebanyak 100 μl reagen *Nessler*, inkubasi selama 1 menit. Pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer λ 425 nm. Kemudian masing-masing nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan linear kurva standar ammonia. Penentuan aktivitas urease pada penelitian ini dilakukan dengan mengukur produk yang dihasilkan dari reaksi enzim dengan substrat urea yaitu ammonia ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Satu unit (U) aktivitas urease diartikan sebagai jumlah produk yang dihasilkan (μmol ammonia/ml/menit) (Phang *et al.* 2018).

Aktivitas enzim (U/ml) =

$$\frac{\text{Konsentrasi ammonia } (\mu\text{g} / \text{ml})}{\text{BM ammonia } (\text{g/mol}) \times \text{waktu inkubasi (mnt)}}$$

Tahap keempat adalah pengujian presipitasi kalsium karbonat. Uji presipitasi bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam mengendapkan kalsium karbonat. Sebanyak 0,6 ml inokulum (10^5 cfu/ml) diinokulasikan ke dalam 30 ml medium NB-U/Ca dan diinkubasi di atas shaker (130 rpm) pada suhu 30°C selama 7 hari. Medium NB-U/Ca yang tidak diinokulasikan isolat digunakan sebagai kontrol. Kehadiran kristal kalsium karbonat ditandai dengan adanya butiran berwarna putih (presipitat CaCO_3) yang terdapat dibagian bawah medium. Presipitat CaCO_3 disaring menggunakan kertas saring (Whatman No. 42) yang sebelumnya telah dikeringkan di oven pada suhu 60 °C selama 3 jam lalu ditimbang. Berat presipitat CaCO_3 dihitung dengan rumus (Krishnapriya and Venkatesh 2015). Semua data yang diperoleh selanjutnya dianalisis.

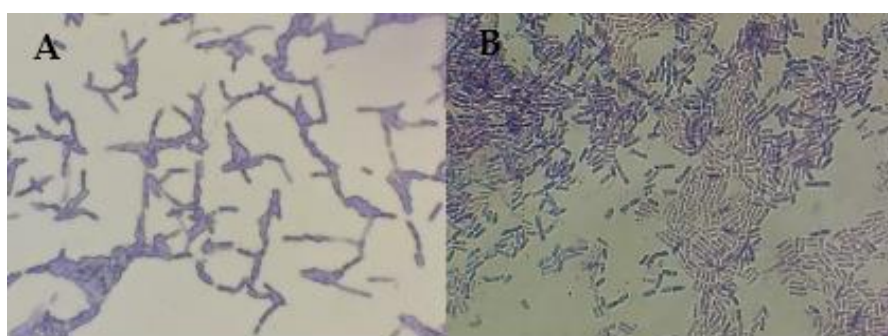
$$W_c = W_{fc} - W_f$$

Keterangan :

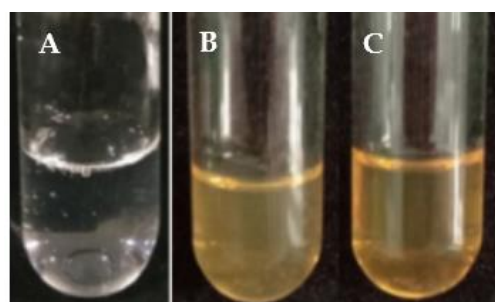
W_c =berat presipitat (g), W_{fc} = berat kertas saring dan presipitat (g), W_f =berat kertas saring (g)

HASIL

Bacillus SP 34 dan *Bacillus* SP 83 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bakteri berbentuk batang dan Gram positif seperti pada Gambar 1. Berdasarkan hasil penelitian dari pengujian aktifitas enzim urease menggunakan *Bacillus* SP 34 dan *Bacillus* SP 83 diperoleh hasil reaksi enzim dengan warna yang berbeda-beda. Hasil reaksi menunjukkan terjadi perubahan perbedaan warna antara kontrol dan isolat bakteri uji. Supernatan dari *Bacillus* SP 83 berwarna lebih kuning berbanding *Bacillus* SP 34 (Gambar 2).



Gambar 1. Pewarnaan Gram. A. *Bacillus* SP 34, B. *Bacillus* SP 83



Gambar 2. Hasil reaksi uji aktivitas urease. A. Kontrol B. *Bacillus* SP 34 C. *Bacillus* SP 83

Tabel 1. Aktivitas enzim urease

Isolat	Aktivitas Enzim Urease (U/ml)
<i>Bacillus</i> SP 34	0,058±0,002
<i>Bacillus</i> SP 83	0,065±0,002

Tabel 2. Produksi kalsit pada medium NB-U/Ca

Isolat	Jumlah kalsit (mg)
<i>Bacillus</i> SP 34	169
<i>Bacillus</i> SP 83	105

PEMBAHASAN

Beberapa penelitian menunjukkan umumnya bakteri Gram positif berbentuk batang mampu menghasilkan enzim urease dan presipitat kalsium karbonat. Beberapa contoh adalah *Bacillus sphaericus* yang digunakan untuk biosintesis kalsium karbonat (Seifan *et al.* 2016), *Sporosarcinapasteurii* yang merupakan bakteri ureolitik penghasil enzim urease (Soon *et al.* 2013), dan juga bakteri genus *Brevundimonas* yang diisolasi dari gua-gua karst (Wei *et al.* 2015).

Enzim urease bekerja untuk menghidrolisis urea ketika substrat urea tersedia. Hasil reaksi menjadi berwarna kuning setelah ditambahkan reagen *Nessler*. Amonia dapat terukur oleh spektrofotometer melalui perubahan warna reaksi supernatan isolat bakteri. Reagen *Nessler* yang tidak berwarna (bening) akan berubah menjadi kuning ketika bereaksi dengan amonia yang terkandung pada supernatan isolat bakteri ureolitik (Gambar 2).

Tabel 1 menunjukkan aktivitas enzim urease dari kedua isolat bakteri berbeda. *Bacillus* SP 83 menghasilkan aktifitas urease lebih tinggi berbanding *Bacillus* SP 34. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilaporkan oleh Okay dan Rodrigues (2013) menggunakan isolat bakteri *Sporosarcina pasteurii* ATCC 11859 yang telah bereaksi dengan substrat urea pada medium *Stuart's Broth* selama 60 menit menghasilkan aktivitas enzim urease sebesar 17,21 U/ml dan pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 560 nm setelah direaksikan bersama reagen *Nessler* selama 1 menit. Aparna *et al.* 2015 melaporkan aktivitas enzim urease dari isolat bakteri BS-13 sebesar 2,52 U/ml setelah direaksikan bersama substrat urea selama 48 jam, pengukuran absorbansi dilakukan setelah sampel bereaksi dengan reagen *Nessler* selama 1 menit pada panjang gelombang 405 nm. Phang *et al.* (2018) bakteri uji menghasilkan aktivitas urease sebesar 15 U/ml setelah direaksikan dengan substrat urea selama 240 menit dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 425 nm setelah direaksikan bersama reagen *Nessler* selama 1 menit. Hasil penelitian ini dapat diketahui isolat bakteri, waktu inkubasi serta panjang gelombang yang berbeda dapat mempengaruhi aktivitas enzim urease yang dihasilkan.

Pengujian aktivitas enzim urease pada penelitian ini dilakukan pada supernatan isolat bakteri dalam kondisi basa yaitu pH 8. Menurut Stocks-Fischer *et al.* (1999) pH optimal untuk aktivitas enzim urease berkisar antara pH 7.0 hingga pH 8.0. Aktivitas enzim urease yang terkandung di dalam bakteri ureolitik juga berperan besar dalam proses pengendapan kalsit sehingga pengaplikasian bakteri ureolitik banyak dimanfaatkan dalam bidang konstruksi.

Tabel 2 menunjukkan ada perbedaan jumlah kalsit yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri. *Bacillus* SP 34 lebih tinggi jumlah kalsit yang dihasilkan berbanding *Bacillus* SP 83. Perbedaan jenis bakteri memiliki kemampuan optimal dalam menghasilkan aktivitas urease dan presipitasi kalsium karbonat. Menurut Aparna *et al.* 2015 perbedaan jumlah kalsit dapat disebabkan oleh jenis isolat, waktu inkubasi serta panjang gelombang yang digunakan saat pengukuran.

Kelompok *Bacillus* merupakan tipe bakteri yang umum digunakan sebagai penghasil urease dan kalsium karbonat. *Bacillus* sp. merupakan organisme utama yang digunakan untuk berbagai aplikasi seperti remediasi logam berat (Pb) (Kang *et al.* 2015), penutupan retak beton (Hammad *et al.* 2013; Krishnapriya and Venkatesh 2015) dan meningkatkan sifat tanah (Tronics 2011).

Jumlah inokulum yang digunakan untuk uji aktivitas urease dan produksi kalsit juga mempengaruhi. Penelitian ini sejalan dengan Krishnapriya and Venkatesh (2015) melaporkan *Bacillus megaterium* mengendapkan kalsit jumlah inokulum 10^5 cfu/ml. Bang dan Ramakrishnan (2001) melaporkan jumlah inokulum *Bacillus pasteurii* yang baik yaitu 10^9 cfu/ml untuk menghasilkan produksi kalsit terbaik. Perbedaan jumlah inokulum pada jenis bakteri yang berbeda akan sangat mempengaruhi kemampuannya dalam membentuk kalsium karbonat.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan *Bacillus* SP 34 aktivitas urease adalah 0,058 U/ml dan produksi kalsit 169 mg. *Bacillus* SP 83 aktivitas urease adalah 0,065 U/ml dan produksi kalsit 105 mg.

DAFTAR PUSTAKA

Aparna A, Sujoy B and Kamal D. 2015. Comparative Characterization of Urease Secreting Bacterial and Fungal Isolates from Soil Sample of Farm Fields. *International Journal of Advance Science Technology Reserch* 4(5): 138–150.

- Bang SS and Ramakrishnan V. 2001. Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR). Proceedings of the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes 3–13.
- Burbank MB, Weaver TJ, Williams BC and Crawford RL. 2012. Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria. *Geomicrobiol Journal* 29: 389–395.
- Castanier S, Levrel GLM, Perthuisot JP. 1999. Ca-Carbonates Precipitation and Limestone Genesis-The Microbiologist Point of View. *Sedimentary Geology* 126: 9–23.
- Glibert PM, Harrison J, Heil C dan Seitzinger S. 2006. Escalating Worldwide Use of Urea-A Global Change Contributing to Coastal Eutrophication. *Biogeochemistry* Vol. 77(3): 441–463.
- Hammad IA, Talkhan FN and Zoheir AE. 2013. Urease Activity and Introduction of Calcium Carbonate Precipitation by *Sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841. *Journal of Applied Sciences Research* Vol. 9(3): 1525–1533.
- Hammes F, Verstraete W. 2002. Key Roles of pH and Calcium Metabolism in Microbial Carbonate Precipitation. *Reviews in Environ Sci & Biotechnol* 1: 3–7.
- Kang CH, Oh SJ, Han SH, Nam IH. 2015. Bioremediation of Lead by Ureolytic Bacteria Isolated from Soil at Abandoned Metal Mines in South Korea. *Ecological Engineering* Vol. 74:402–407.
- Krishnapriya S and Venkatesh BDL. 2015. Isolation and Identification of Bacteria to Improve the Strength of Concrete. *Microbiological Research* 174: 48–55.
- Ningsih MDS, Linda TM dan Fibriarti BL. 2018. Isolasi dan Keragaman Bakteri Ureolitik Lokal Riau yang Berpotensi Sebagai Campuran Beton. *Al-Kauniyah: Journal of Biology* Vol. 11(1): 57–63.
- Okay OT and Frigi Rodrigues D. 2013. High Throughput Colorimetric Assay for Rapid Urease Activity Quantification. *Journal of Microbiology Methods* 95: 324–326.
- Omeregic AI, Senian N, Li P.Y, Hei N.L, Leong DOE, Ginjom IRH and Nissom PM. 2016. Ureolytic bacteria Isolated from Sarawak Limestone Caves Show High Urease Enzyme Activity Comparable to that of *Sporosarcina pasteurii* (DSM 33). *Malaysian Journal of Microbiology* Vol.12(6): 463–470.
- Phang IRK, Chan YS, Wong KS and Lau SY. 2018. Isolation and Characterization of Urease-Producing Bacteria from Tropical Peat. *Biocatalytic and Agriculture Biotechnology* 13: 168–175.
- Seifan M, Samani AK and Berenjian A. 2017. A Novel Approach to Accelerate Bacterially Induced Calcium Carbonate Precipitation Using Oxygen Releasing Compounds (ORCs). *Biocatalytic Agriculture Biotechnology* 12: 299–307.
- Soon NW, Lee LM, Khun TC and Ling HS. 2013. Improvements in Engineering Properties of Soils Through Microbial-Induced Calcite Precipitation. *KSCE Journal Civil Engineering* Vol. 17(4): 718–728.
- Stocks-Fischer S, Galinat JK and Bang SS. 1999. Microbiological Precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry* Vol.31: 1563–1571.
- Tronics A. 2011. Studi Awal Pemanfaatan Teknik Biogrouting pada Tanah Pasir untuk Proses Sementasi [Tesis]. Dipublikasikan. Diakses melalui <http://lib.ui.ac.id/file?file=digital/20292311-T29729-Studi%20awal.pdf> pada 12 Agustus 2020.
- 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 Journal Microbiology* Vol. 2(46): 455–464.

Available Online: 30 November 2021

Published: 31 Januari 2022

Authors:

Tetty Marta Linda, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Jl. HR. Soebrantas, Km. 12.5, Pekanbaru, 28293, Indonesia, e-mail: etty.martalinda@gmail.com.

Mufidah Dwi Suci Ningsih, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Jl. HR. Soebrantas, Km. 12.5, Pekanbaru, 28293, Indonesia, email: mufidahdwisuciningih@gmail.com.

Bernadeta Leni Fibriarti, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Jl. HR. Soebrantas, Km. 12.5, Pekanbaru, 28293, Indonesia, e-mail: bernadeta_leni@yahoo.com.

Saras Andini, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Jl. HR. Soebrantas, Km. 12.5, Pekanbaru, 28293, Indonesia, e-mail: sarahandini14@gmail.com.

Dedi Putra Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Kejuruan dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Riau, Jl. HR. Soebrantas, Km. 12.5, Pekanbaru, 28293, Indonesia, e-mail: putra.dedi@yahoo.com.

How to cite this article:

Linda TM, Ningsih MDS, Fibriarti BL, Andini S, Putra D, 2022. Aktivitas Urease dan Pembentukan Kalsium Karbonat oleh Bakteri Ureolitik. *LenteraBio*; 11(1): 139–143