

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**



**MUHAMMAD RIZAL UDIN
H041201071**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

**MUHAMMAD RIZAL UDIN
H041 20 1071**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

MUHAMMAD RIZAL UDIN
H041 20 1071

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

MUHAMMAD RIZAL UDIN
H041 20 1071

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada "03 Juli 2024"
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

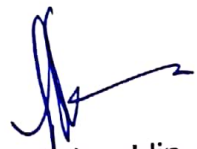
Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



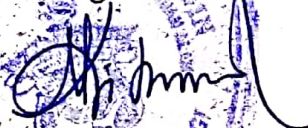
Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si
NIP. 196801291997022001

Pembimbing Pertama,



Prof. Dr. Fahrudin, M.Si
NIP. 196509151991031002

Mengetahui:
Ketua Program Studi



Dr. Magdalena Litaay, M.Sc.
NIP. 196409291989032002




PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep” adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Nur Haedar, S.Si.,M.Si. sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Fahrudin, M.Si. sebagai Pembimbing Pertama). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 3 Juli 2024



Muhammad Rizal Udin
H041 20 1071

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah rabbil 'alamin, Puji syukur selalu tercurahkan kepada Ilahi Rabbi Allah SWT. yang telah memberikan limpahan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dan menyusun skripsi berjudul **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep**. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Nabiullah Muhammad SAW. yang telah memberikan peradaban kepada kita di sepanjang zaman. Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Selain itu, skripsi ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan peneliti lain untuk menambah wawasan dalam bidang biologi khususnya mikrobiologi.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan skripsi ini banyak mengalami kendala, namun berkat bantuan, bimbingan, kerjasama dari berbagai pihak dan berkah dari Allah SWT. sehingga kendala-kendala yang penulis hadapi dapat diatasi. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada orang tua beserta seluruh keluarga yang telah memberikan do'a, motivasi, semangat, dukungan dan perjuangan sehingga penulis bisa menempuh pendidikan hingga perguruan tinggi dan bisa berada di titik ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si selaku pembimbing utama atas bimbingan, arahan, waktu, pikiran, kritik, kesabaran serta ilmu yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini. Terima kasih kepada pembimbing pertama Prof. Dr. Fahrudin, M.Si yang telah memberikan bimbingan, arahan dan motivasi kepada Penulis sehingga skripsi ini dapat selesai pada waktu yang tepat. Pada kesempatan ini pula, dengan segala kerendahan hati Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Dr. Eng. Amiruddin, M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Dr. Magdalena Litaay, M.Sc., selaku Ketua Program Studi S-1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
4. Dody Priosambodo, S.Si., M.Si selaku dosen Penasehat Akademik (PA) sekaligus dosen penguji dan Andi Evi Erviani, S.Si., M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, saran dan dukungan yang diberikan kepada penulis hingga penyusunan skripsi ini.
5. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses

perkuliahan. Staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan administrasi.

6. Kak Fuad Gani, S.Si, Kak Heriadi, S.Si.,M.Si, Kak Nenis Sardiani, S.Si dan Kak Syafrin, S.Si yang telah banyak memberikan bantuan terhadap penelitian ini baik ilmu, bimbingan, kritik maupun saran yang sangat berguna bagi penulis.
7. Kak Nur Afifah Zhafirah S.Si.,M.Si, Kak Faisal S.Si dan Kak Nur Husnul Khotimah S.Si yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam penyusunan skripsi penulis.
8. Teman-teman peneliti Ahmad Nurfakhry Salim, Amelya Madani Putri, Andi Alfhito Ardiansyah, Doni, Dzulkifli, Dzulfaida Rajasa, Sarwan dan Suci Wulandari yang telah menemani, mendukung dan membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.
9. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2020, terima kasih atas do'a, dukungan dan kerjasama yang diberikan selama perkuliahan.
10. Seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Pada akhirnya penulis berterima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi hingga akhir penyusunan skripsi ini, semoga Tuhan senantiasa melimpahkan rahmat dan lindungan-Nya kepada kita semua, Aamiin. Akhir kata, penulis memohon maaf atas kesalahan yang disengaja maupun tidak disengaja dalam rangkaian penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Makassar, 3 Juli 2024

Muhammad Rizal Udin

ABSTRAK

MUHAMMAD RIZAL UDIN. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep** (dibimbing oleh Nur Haedar dan Fahrudin).

Latar belakang. Bakteri ureolitik merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menguraikan urea yang bereaksi dengan air, dihidrolisis oleh enzim urease kemudian diubah menjadi asam karbamat dan amonia. **Tujuan.** Penelitian ini adalah untuk mengetahui dan mendapatkan jenis bakteri ureolitik yang mampu menghasilkan amonia yang berasal dari lukisan prasejarah asal kawasan Karst Maros-Pangkep. **Metode.** Seleksi bakteri ureolitik dilakukan dengan menggunakan medium Christensen Urea Agar. Uji potensi bakteri ureolitik dilakukan dengan mengukur nilai pH, kepadatan sel dan konsentrasi amonia. Identifikasi bakteri dilakukan menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA. **Hasil.** Dua puluh titik sampling hasil swab dari gua Sumpang Bitu, gua Leang Timpuseng dan gua Leang Pettae, 13 isolat positif termasuk ke dalam bakteri ureolitik. Hasil pengukuran konsentrasi amonia diperoleh tiga isolat yang memiliki kemampuan paling tinggi dalam menghasilkan amonia yaitu isolat SPB 3-d dengan nilai konsentrasi amonia sebesar 205,394 ppm yang mewakili gua Sumpang Bitu, isolat LTP 3-b dengan nilai konsentrasi amonia sebesar 97,510 ppm yang mewakili gua Leang Timpuseng dan isolat LPE 4-a dengan nilai konsentrasi amonia sebesar 101,659 ppm yang mewakili gua Leang Pettae. **Kesimpulan.** Hasil identifikasi molekuler diperoleh isolat SPB 3-d termasuk jenis *Proteus mirabilis* strain HN2p, isolat LTP 3-b termasuk jenis *Proteus mirabilis* strain PJC11 dan isolat LPE 4-a termasuk jenis *Proteus mirabilis* strain MPE4069.

Kata Kunci: Karst Maros-Pangkep, Konsentrasi Amonia, Bakteri Ureolitik

ABSTRACT

MUHAMMAD RIZAL UDIN. **Isolation and Identification of Ureolytic Bacteria from Prehistoric Paintings from Maros-Pangkep Karst Area** (supervised by Nur Haedar dan Fahrudin)

Background. Ureolytic bacteria are microorganisms that have the ability to decompose urea which reacts with water, hydrolysed by the enzyme urease and then converted into carbamic acid and ammonia. **Purpose.** The purpose of this study was to determine and obtain the type of ureolytic bacteria capable of producing ammonia derived from prehistoric paintings from the Maros-Pangkep Karst area. **Method.** Selection of ureolytic bacteria was carried out using Christensen Urea Agar medium. The potential of ureolytic bacteria was tested by measuring pH value, cell density and ammonia concentration. **Results.** Bacterial identification was performed using 16S rRNA gene molecular markers. Twenty sampling points of swab results from Sumpang Bitu cave, Leang Timpuseng cave and Leang Pettae cave, 13 positive isolates are included in ureolytic bacteria. The results of ammonia concentration measurements obtained three isolates that have the highest ability to produce ammonia, namely isolate SPB 3-d with an ammonia concentration value of 205,394 ppm representing Sumpang Bitu cave, isolate LTP 3-b with an ammonia concentration value of 97,510 ppm representing Leang Timpuseng cave and isolate LPE 4-a with an ammonia concentration value of 101,659 ppm representing Leang Pettae cave. **Conclusion.** Molecular identification results obtained isolate SPB 3-d belongs to *Proteus mirabilis* strain HN2p, isolate LTP 3-b belongs to *Proteus mirabilis* strain PJC11 and isolate LPE 4-a belongs to *Proteus mirabilis* strain MPE4069.

Keywords: Karst Maros-Pangkep, Ammonia Concentration, Ureolytic Bacteria.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat	3
BAB II METODE PENELITIAN	4
2.1 Tempat dan Waktu	4
2.2 Alat dan Bahan	4
2.2.1 Alat	4
2.2.1 Bahan	4
2.3 Metode Kerja	5
2.3.1 Pengambilan Sampel	5
2.3.2 Sterilisasi Alat	5
2.3.3 Pembuatan Media	5
2.3.4 Isolasi Bakteri	6
2.3.5 Seleksi Bakteri Ureolitik	6
2.3.6 Karakterisasi Bakteri Ureolitik	6
Pengamatan Morfologi Koloni	6
Pengamatan Morfologi Sel	6
Uji Biokimia	7
2.3.7 Uji Potensi Bakteri Ureolitik	7

Pengukuran Nilai pH.....	7
Pengukuran Kepadatan Sel.....	7
Pengukuran Konsentrasi Amonia	8
2.3.8 Identifikasi Isolat Bakteri Ureolitik dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 16S rRNA.....	8
Ekstraksi DNA.....	8
Amplifikasi DNA dengan Metode PCR	9
Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis.....	9
Sekuensing DNA	9
Analisis Urutan DNA.....	9
2.4 Analisis Data	9
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	10
3.1 Lokasi Pengambilan Sampel	10
3.2 Isolasi Bakteri Ureolitik.....	11
3.3 Seleksi Bakteri Ureolitik	11
3.4 Karakterisasi Bakteri Ureolitik	13
3.4.1 Pengamatan Morfologi.....	13
Pengamatan Morfologi Koloni.....	13
Pengamatan Morfologi Sel.....	15
3.4.2 Uji Biokimia	17
Uji SIM (<i>Sulfide Indol Motility</i>)	17
Uji Sitrat.....	19
Uji MR-VP (<i>Methyl Red Voges Proskauer</i>).....	20
Uji Katalase	22
3.5 Uji Potensi Bakteri Ureolitik.....	23
3.5.1 Pengukuran Nilai pH	23
3.5.2 Pengukuran Kepadatan Sel	24
3.5.3 Pengukuran Konsentrasi Amonia	25
3.6 Analisis Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA.....	26
BAB IV PENUTUP	29
4.1 Kesimpulan	19
4.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Hasil Seleksi Bakteri.....	12
2. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel.....	13
3. Hasil Uji Biokimia.....	17
4. Hasil BLAST Isolat Bakteri SPB 3-d, LTP 3-b dan LPE 4-a.....	27

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Lokasi Pengambilan Sampel Bakteri Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Gua Sumpang Bitu (SPB), Gua Leang Timpuseng (LTP), Gua Leang Pettae (LPE)	10
2. Penampakan Lukisan pada Lokasi Penelitian.....	11
3. Hasil Seleksi Bakteri Ureolitik pada Media Christensen Urea Agar	12
4. Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	13
5. Hasil Pengamatan Morfologi Sel Bakteri.....	15
6. Hasil Uji SIM Bakteri Ureolitik.....	18
7. Hasil Uji Sitrat Bakteri Ureolitik.....	19
8. Hasil Uji <i>Methyl Red</i> Bakteri Ureolitik	20
9. Hasil Uji <i>Voges Proskauer</i> Bakteri Ureolitik	21
10. Hasil Uji Katalase Bakteri Ureolitik	22
11. Hasil Pengukuran Nilai pH.....	23
12. Hasil Pengukuran Kepadatan Sel.....	24
13. Pengukuran Konsentrasi Amonia	25
14. Hasil elektroforesis Gen 16S rRNA dengan Primer 63F dan 1387R Isolat Bakteri SPB 3-d, LTP 3-b dan LPE 4-a pada 1300 bp.....	26
15. Filogeni dengan metode UPGMA pada isolat SPB 3-d, LTP 3-b dan LPE 4-a	28

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian	34
2. Skema Kerja Pengambilan Sampel, Isolasi dan Seleksi Bakteri Ureolitik	35
3. Skema Kerja Uji Potensi Bakteri Ureolitik	36
4. Skema Kerja Pengukuran Nilai pH, Kepadatan Sel dan Konsentrasi Amonia Bakteri Ureolitik	37
5. Skema Kerja Ekstraksi DNA Bakteri	38
6. Skema Kerja Amplifikasi DNA dengan PCR	39
7. Skema Kerja Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	40
8. Lokasi Pengambilan Sampel	41
9. Hasil Seleksi Bakteri Ureolitik	42
10. Uji Potensi Bakteri Ureolitik	43
11. Hasil Perhitungan Kepadatan Sel Bakteri Ureolitik	44
12. Hasil Perhitungan Konsentrasi Amonia Bakteri Ureolitik	45
13. Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Ureolitik	46
14. Identifikasi Jenis Bakteri Menggunakan Marka Molekuler Isolat SPB 3-d, LTP 3-b dan LPE 4-a	47
15. Foto Prosedur Penelitian	52

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal dengan topografi karst yang luas membentang hampir di seluruh pulau-pulau, sebarannya meliputi hampir seluruh kepulauan Indonesia kurang lebih 15 juta hektar. Karst merupakan istilah bahasa Jerman yang diturunkan dari bahasa Slovenia (*kras*) yang berarti lahan gersang berbatu (Karongi et al. 2023). Karst merupakan suatu bentang alam yang terbentuk dari batuan kapur (CaCO_3) dan magnesium karbonat (MgCO_3) yang telah mengalami pelarutan oleh karbondioksida (CO_2) di atmosfer melalui air hujan atau yang berasal dari sisa tanaman. Meskipun keberadaan karst biasanya terjadi di daerah berbatuan karbonat, namun terdapat pula pada batuan lain yang mudah larut dan memiliki porositas sekunder seperti batu gips dan batu garam. Karst rentan terhadap kerusakan karena komponen batuan kapur yang terdapat di dalamnya yang mudah larut oleh air (Shiska et al. 2017). Salah satu kawasan karst yang memiliki potensi yang bagus dan rentang mengalami kerusakan adalah kawasan karst Maros-Pangkep.

Kawasan karst Maros-Pangkep (KKMP) merupakan ekosistem karst unik yang termasuk dalam bagian dari pegunungan Bulusaraung di utara Maros dan bagian selatan Pangkep. Sekitar 40.000 hektar dari kawasan ini kaya akan flora dan fauna, yang bernilai ilmiah, sosial, budaya dan ekonomi. Kawasan tersebut berada di bawah tekanan dari persaingan penggunaan kegiatan ekonomi, seperti pertambangan untuk industri semen dan marmer (Fatinaware et al. 2019). Adanya kegiatan-kegiatan tersebut kemudian dapat menimbulkan efek jangka panjang yang dapat merusak kawasan karst. Kawasan karst Maros-Pangkep merupakan salah satu kawasan karst yang dijadikan sasaran dari kegiatan eksploitasi yang dilakukan oleh beberapa Industri pembangunan, salah satunya adalah industri semen dan marmer. Tercatat lebih dari 100 izin tambang dilakukan industri-industri pembangunan seperti semen dan marmer untuk mengeksploitasi kawasan karst Maros-Pangkep, dan luas kawasan karst yang dieksploitasi hampir mencapai 3600 hektar. Dengan dilakukannya eksploitasi kawasan karst maka akan merusak fungsi alaminya, seperti sebagai sumber air bawah tanah, hilangnya habitat satwa liar, rusaknya berbagai macam tanaman asli dan hilangnya situs bersejarah yang ada pada kawasan tersebut (Magetanapu et al. 2023).

Menurut Brahmantara (2016), salah satu peninggalan prasejarah yang ada di kawasan karst yaitu lukisan cadas (*rock art*). Lukisan cadas (*rock art*) didefinisikan sebagai lukisan, gambar, atau pahatan yang dibuat pada batu alamiah yang masih melekat pada batuan induknya. Lukisan, gambar, atau pahatan ini dapat dibuat pada dinding-dinding batu, baik di dalam gua maupun di tempat-tempat terbuka, atau dibuat pada bongkahan batu maupun pada lempengan batu yang terbentuk secara alamiah. Sejatinya lukisan dinding gua dengan lingkungan alamiah gua itu sendiri sudah mencapai titik keseimbangan tertinggi. Oleh

karenanya, lukisan dinding gua yang sudah beribu bahkan puluhan ribu tahun usianya masih dijumpai dalam keadaan yang masih baik. Bentuk gambar dan warnanya belum banyak berubah seperti aslinya dahulu. Namun, ketika lingkungan gua yang pada umumnya berada di daerah karst yang sangat rentan tersebut berubah, maka gambar-gambar dalam gua pun mulai mengalami ancaman. Dalam kenyataan di lapangan dapat terlihat dari jumlah dan jenis gambar yang pernah dilaporkan oleh para peneliti terdahulu pada situs tertentu yang semakin berkurang. Selain itu, kualitas gambar juga telah mengalami penurunan dari tahun ke tahun seperti terkelupas, tergores, tertutup lumut, tertutup lelehan air kapur, tertutup ganggang, serta keberadaan mikroorganisme yang mengendapkan batuan kapur. Lukisan ini merupakan salah satu situs yang memiliki daya tarik tersendiri, baik dari wisatawan lokal maupun mancanegara yang telah ditetapkan sebagai cagar budaya warisan UNESCO. Lukisan ini rentang mengalami kerusakan yang disebabkan oleh faktor dari manusia maupun faktor dari alam. Situs ini hanya merupakan sebagian kecil dari kawasan karst yang harus dilindungi dari kerusakan.

Banyak faktor yang kemudian dapat merusak kawasan karst itu sendiri, baik secara kimia, fisika dan biologis. Secara kimia yaitu akibat terjadinya pelarutan oleh air hujan dan air permukaan yang mengandung CO_2 atau asam-asam organik. Semakin tinggi konsentrasi CO_2 dan asam, maka proses pelarutan batuan kapur (CaCO_3) semakin cepat sehingga lukisan cadas pada batuan kapur tersebut juga akan ikut mengalami kerusakan. Secara fisika yaitu terjadinya erosi permukaan oleh air hujan. Runtuhnya gua-gua dan ceruk di permukaan karst akibat getaran, gempa bumi atau beban berlebih di atasnya. Penyumbatan aliran air bawah tanah yang menyebabkan genangan dan banjir. Secara biologis yaitu adanya aktivitas perakaran tumbuhan yang dapat memperluas retakan dan celah pada batuan kapur. Aktivitas hewan-hewan serangga, seperti membuat sarang yang dapat menyebabkan kerusakan pada permukaan batuan kapur. Pelapukan batuan akibat aktivitas mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur yang dapat merusak batuan kapur. Salah satu mikroorganisme yang dapat mempercepat kerusakan karst adalah bakteri. Beberapa jenis bakteri yang terdapat pada lukisan cadas di kawasan karst seperti bakteri karbonoklastik yang mampu mengendapkan batuan kapur serta bakteri ureolitik yang mampu menghasilkan amonia dari hasil hidrolisis urea yang pada substrat (Endarto et al. 2015).

Bakteri ureolitik merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk menguraikan urea yang bereaksi dengan air, dihidrolisis oleh enzim urease kemudian diubah menjadi asam karbamat dan amonia. Asam karbamat ini kemudian bereaksi lagi dengan air, dan diubah menjadi amonia dan asam karbonat. Asam karbonat berdisosiasi menjadi dua ion hidrogen dan ion karbonat. Amonia bereaksi dengan air dihidrolisis menjadi ion amonium dan ion hidroksida. Selanjutnya Ion hidroksida (OH^-) hadir dalam kondisi basa atau alkalis yang kemudian memicu peningkatan pH. Ion kalsium yang ada pada substrat kemudian akan bereaksi dengan ion karbonat untuk membentuk endapan kalsium karbonat. Proses pengendapan ini terjadi melalui nukleasi heterogen pada dinding sel bakteri setelah tercapai kejenuhan. Secara sederhana, bakteri ureolitik menggunakan

enzim urease dalam mengubah urea menjadi amonia untuk menghasilkan kristal kalsium karbonat. Urea sebagai substrat yang terdapat di dalam gua, umumnya berasal dari kotoran hewan seperti kelelawar dan burung. Kotoran kelelawar dan burung yang terakumulasi di dalam gua atau di sekitar tempat mereka bersarang. Kotoran ini kaya akan nitrogen, fosfor, dan senyawa organik lainnya. Proses dekomposisi kotoran ini akan menghasilkan senyawa urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$). Urea ini terbentuk dari proses metabolisme nitrogen dalam tubuh hewan-hewan tersebut. Bakteri ureolitik menggunakan amonia dari urea untuk meningkatkan pH sekitar sel bakteri. Kondisi pH yang tinggi ini memicu pengendapan kalsium karbonat, yang membantu dalam pembentukan biofilm. Pertumbuhan bakteri ureolitik ini dapat menyebabkan peningkatan produksi asam karbonat dan pembentukan lebih banyak kalsium karbonat, yang pada gilirannya akan mempercepat kerusakan karst (Novanti & Zulaika, 2019). Dalam jangka panjang, kerusakan karst yang disebabkan oleh bakteri ureolitik dapat berdampak pada rusaknya lukisan cadas sebagai situs prasejarah yang ada di dalam gua tersebut. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui jenis bakteri ureolitik yang terdapat pada kawasan karst Maros-Pangkep.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat bakteri ureolitik yang berasal dari kawasan karst Maros-Pangkep.
2. Mengetahui jenis bakteri ureolitik pada kawasan karst Maros-Pangkep.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai sumber informasi ilmiah mengenai jenis bakteri ureolitik yang terdapat pada kawasan karst Maros-Pangkep.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2023-April 2024. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar lukisan batu pada kawasan karst Maros-Pangkep. Isolasi dan Karakterisasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Uji Konsentrasi Amonia dilakukan di Laboratorium Riset Biologi Terpadu, Departemen Biologi dan Isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains (LPPS) Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, objek glass, batang pengaduk, batang L, jarum ose, bunsen, pipet tetes, spoit, sendok tanduk, penjepit batang, *cool box*, mikroskop cahaya, mikroskop stereo, *shaker* (HEALTH), oven (Heraeus), lemari pendingin, *hot plate*, inkubator, autoklaf (American), vortex, spektrofotometer, spektrofotometer UV-VIS (Thermo), timbangan analitik (OHAUS), *laminar air flow*, aluminium foil, DNA *thermal cycler* (*applied biosystems*), seperangkat alat PCR dan elektroforesis+tip supplay.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Sampel: lukisan batuan karst.
- Media: medium Christensen Urea Agar, medium Nutrient Agar (NA), medium Nutrient Broth (NB), medium *Sulfide Indol Motility* (SIM), medium *Simmon Citrate Agar* (SCA), medium *Methyl Red-Voges Proskauer* (MR-VP).
- Primer: Primer forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer reversal 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'),
- Bahan lainnya: akuades, pepton, *beef extract*, NaCl, glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol, *phenol red*, kristal violet, lugol, alkohol-aseton, safranin, reagen Kovac's, *methyl red*, KH₂PO₄, KOH 40% , alfa naftol, H₂O_s, *sulfanilic acid*, *α-naphthylamine*, minyak imersi, anti jamur ketoconazol, safranin, kertas label, *tissue*, *cotton swab*, kapas, *aluminium foil*, kit isolasi DNA bakteri (Geneaid), 1xMytaq HS Red Mix (Bioline), ddH₂O, gel agarosa, loading dye, etidium bromide (EtBr), presto mini gDNA Bacteria Kit (100 Preps), larutan GA buffer larutan GB buffer, larutan GD buffer, proteinase K, etanol absolut, larutan wash buffer, elution buffer, marker 100 bp, larutan TAE buffer, label, *nuclease free water* dan 2xMytaq HS Red Mix.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari lokasi kawasan karst Maros-Pangkep, yaitu di gua Sumpang Bitu, gua Leang Timpuseng dan gua Leang Pettae. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *swab* menggunakan *cotton swab* pada bagian batuan karst, lalu dimasukkan ke dalam larutan pepton water dan disimpan di dalam *cool box*. Selanjutnya untuk proses isolasi dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.3.2 Sterilisasi Alat

Teknik sterilisasi alat dan medium: Alat-alat gelas berupa tabung reaksi, cawan petri dan objek gelas disterilkan dengan cara panas kering (udara panas) pada oven. Sterilisasi dilakukan pada suhu 180°C selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan cara panas kering di atas nyala api bunsen sampai merah membara. Medium dan air suling disterilisasi dengan panas basah menggunakan autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Pembuatan Media

Medium Christensen Urea Agar. Medium Christensen Urea Agar dibuat dengan cara menimbang 2,4 gram media ke dalam 95 ml akuades lalu dipanaskan hingga larut, disterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm, lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Ditambahkan 5 ml larutan urea 40% yang sudah disterilisasi (Ambarsari et al. 2020).

Medium Nutrient Agar (NA). Medium NA ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dipanaskan di atas *hot plate* sampai homogen. Lalu dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium Nutrient Broth (NB). Medium NB ditimbang sebanyak 1,8 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml akuades lalu diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larut lalu mulut erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil*. Lalu dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium Sulfide Indol Motility (SIM). Medium SIM ditimbang sebanyak 3 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dipanaskan sampai homogen, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah steril, medium dibiarkan dalam posisi tegak sampai memadat.

Medium Simmon's Citrat Agar (SCA). Medium SCA ditimbang sebanyak 2,42 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dipanaskan sampai

homogen, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah steril, medium dibiarkan dalam posisi miring sampai memadat.

Medium *Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)*. Medium MR-VP ditimbang sebanyak 1,7 gram kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dan dipanaskan sampai homogen, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 5 mL dan ditutup menggunakan kapas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.4 Isolasi Bakteri

Sebanyak 1 mL sampel diinokulasikan pada medium NA dengan teknik sebar menggunakan batang L, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam lalu diamati pertumbuhan koloni yang terbentuk. Koloni yang menunjukkan ciri morfologi yang berbeda selanjutnya dilakukan pemurnian pada media NA sampai diperoleh isolat murni.

2.3.5 Seleksi Bakteri Ureolitik

Selanjutnya masing-masing isolat murni yang diperoleh, diinokulasikan ke media Christensen Urea Agar dengan metode agar miring dan diinkubasi selama 3x24 jam. Pertumbuhan koloni bakteri ureolitik ditandai dengan zona di sekitar koloni akan berubah menjadi merah atau *deep pink* yang menandakan terdapat aktivitas hidrolisis urea dan produksi amonia oleh bakteri.

2.3.6 Karakterisasi Bakteri Ureolitik

Karakterisasi bakteri ureolitik meliputi pengamatan morfologi koloni, morfologi sel dan pengujian biokimia.

Pengamatan Morfologi Koloni. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium Nutrient Agar dengan metode *quadran streak*, kemudian diinkubasi selama 1x24 jam. Koloni yang terbentuk kemudian diamati menggunakan mikroskop stereo. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepian, warna dan elevasi dari koloni bakteri.

Pengamatan Morfologi Sel. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan teknik pengecatan gram untuk melihat bentuk serta sifat gram dari isolat bakteri. Teknik pengecatan gram dilakukan dengan membuat ulasan bakteri pada kaca preparat lalu ditetesi dengan air suling sebanyak 1-2 tetes kemudian difiksasi. Sebanyak 2-3 tetes cairan gram A (kristal violet) ditetaskan pada ulasan bakteri yang telah difiksasi dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan air suling hingga kristal violet meluruh. Sebanyak 2-3 tetes larutan JKJ (lugol) ditetaskan ke dalam ulasan bakteri lalu didiamkan selama 60 detik dan dibilas dengan air suling. Ulasan bakteri kemudian ditetesi dengan alkohol-aseton sebanyak 2-3 tetes lalu didiamkan selama 30 detik dan dibilas menggunakan air suling. Larutan safranin ditetesi sebanyak 2-3 tetes pada ulasan bakteri dan

didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan air suling dan dikeringkan. Hasil pengecatan kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Uji Biokimia. Uji biokimia meliputi uji motilitas, produksi H₂S, uji indol, uji sitrat, uji methyl red, uji voges proskauer dan uji katalase.

Uji Motilitas. Uji motilitas dilakukan untuk melihat adanya kemampuan pergerakan/ motilitas dari bakteri. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat bakteri ke dalam medium SIM (*Sulfide Indol Motility*) dengan metode tusuk, lalu diinkubasi selama 1x24 jam.

Uji Produksi H₂S. Isolat bakteri diinokulasikan medium SIM (*Sulfide Indol Motility*) dengan metode tusuk, lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Terbentuknya H₂S ditandai dengan terdapatnya warna hitam pada dasar medium.

Uji Indol. Isolat bakteri diinokulasikan medium SIM (*Sulfide Indol Motility*) dengan metode tusuk, lalu diinkubasi selama 3x24 jam. Kemudian masing-masing tabung ditetesi reagen Kovac's. Warna merah pada permukaan medium menandakan terbentuknya senyawa indol.

Uji Sitrat. Isolat bakteri diinokulasikan medium SCA (*Simmon's Citrat Agar*) lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon ditandai dengan perubahan warna medium menjadi biru.

Uji Methyl Red. Isolat bakteri diinokulasikan medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) lalu diinkubasi selama 5x24 jam. Kemudian biakan bakteri ditetesi dengan larutan Methyl Red. Terbentuknya cincin merah muda pada permukaan medium menandakan produksi asam campuran oleh bakteri.

Uji Voges Proskauer. Isolat bakteri diinokulasikan medium MR-VP (*Methyl Red-Voges Proskauer*) lalu diinkubasi selama 3x24 jam. Kemudian biakan bakteri ditetesi dengan 0,2 mL larutan KOH 40% dan 0,6 mL larutan alfa naftol dan dikocok. Terbentuknya merah lembayung pada medium menandakan produksi 2,3-butanadiol.

Uji Katalase. Uji katalase dilakukan dengan membuat ulasan bakteri pada kaca preparat kemudian ditetesi dengan larutan H₂O₂. Terbentuknya gelembung gas menandakan produksi enzim katalase oleh bakteri.

2.3.7 Uji Potensi Bakteri Ureolitik

Uji potensi bakteri ureolitik bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis urea. Sebanyak 3ml suspensi bakteri (25% T) diinokulasikan ke dalam 100 ml medium NB U/Ca dan diinkubasi menggunakan shaker (150 rpm) pada suhu 30°C selama 12 hari. Pengujian ini meliputi pengukuran nilai pH, pengukuran kepadatan sel dan pengukuran konsentrasi amonia.

Pengukuran Nilai pH. Untuk menentukan nilai pH, digunakan pH meter sebagai alat ukur yang telah dikalibrasi dengan larutan buffer standar pH 7 dan pH 4. Kemudian diukur pH sebelum dan setelah diinkubasi.

Pengukuran Nilai Kepadatan Sel. Pengukuran kepadatan sel bakteri diperiksa dengan mengamati *Optical Density* (OD). Nilai *Optical Density* (OD) diketahui

dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer. Sebanyak 4 ml suspensi bakteri yang telah dikultur dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 580 nm kemudian dihitung nilai *Optical Density* (OD) (Ambarsari et al. 2020).

Pengukuran Konsentrasi Amonia. Pengukuran konsentrasi amonia bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghidrolisis urea. Pengukuran konsentrasi amonia dilakukan dengan menyaring kultur bakteri menggunakan kertas saring, kemudian sebanyak 1 ml filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian ditambahkan akuades hingga volume 50 ml. Selanjutnya diambil 5 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan masing-masing 0,5 ml larutan Na-fenol dan larutan NaOCl kemudian divortex hingga homogen dan didiamkan selama 5 menit. Pengukuran konsentrasi amonia diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 640 nm. Konsentrasi amonia sampel (x) dapat dihitung dengan meregresikan nilai absorbansi (y) dan konstanta (a, b) dari persamaan $y=ax+b$ (Faisal, 2019).

2.3.8 Identifikasi Isolat Bakteri Ureolitik dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang terdapat dalam Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Pertama dilakukan preparasi sampel, untuk bakteri gram (+) positif, bakteri sebanyak 1×10^9 sel dipindahkan ke 1,5 ml tube mikrosentrifugasi, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm lalu supernatan dibuang. Masukkan 200 μ l buffer GA (buffer gram +) untuk 15 ml *centrifuge tube* dan tambahkan 200 μ l *lysozyme* ke dalam sampel, lalu vortex hingga *lysozyme* benar-benar larut. Inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, lakukan pembalikan setiap 10 menit. Setelah itu, tambahkan 20 μ l proteinase K kemudian vortex sampai proteinase K benar-benar larut. Kemudian masukkan 200 μ l buffer GB dalam sampel kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit untuk hasil yang homogen. Selama inkubasi lakukan pembalikan setiap 3 menit. Setelah itu, tambahkan 200 μ l ethanol (96 %-100%) kemudian vortex agar tercampur selama 15 detik.

Semua campuran dipindahkan ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Buang semua cairan dan tempatkan *spin column* ke dalam tabung pengumpul. Tambahkan 500 μ l buffer GD ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian buang semua cairan dan tempatkan *spin column* CB3 ke dalam tabung pengumpul. Kemudian, tambahkan 600 μ l buffer PW ke *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, buang semua cairan dan tempatkan *spin column* CB3 ke dalam tabung pengumpul. Ulangi langkah ini, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit hingga membran kering sempurna. Tempatkan *spin column* CB3 ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml yang baru dan pipet 50-200 μ l buffer TE, kemudian

inkubasi pada suhu ruang (15- 25°C) selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang tertampung pada tabung eppendorf adalah ekstrak DNA.

Amplifikasi DNA dengan Metode PCR. Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diekstraksi. Dibuat campuran reaksi untuk PCR yaitu 8 µl 1xMytaq HS Red Mix dan masing-masing 1 µl DNA gen 16S rRNA Primer Forward 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer reserval 1387R (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3') dan 2 µl ddH₂O. Selanjutnya disiapkan tabung yang diisi campuran reaksi PCR sebanyak 12 µl lalu ditambahkan 3 µl ekstrak DNA. Homogenkan campuran reaksi PCR dan ekstrak DNA menggunakan vortex, kemudian dimasukkan ke mesin PCR. Amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus dan setiap siklus terdiri dari predenaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 45 detik, *extending* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post extending* pada suhu 72°C selama 10 menit.

Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis. Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,5 gr serbuk agarosa ke dalam 100 mL TAE Buffer di erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 µl Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 17 sumur. Sebanyak 5 µl produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dengan tangki yang berisi TAE Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar atau memiliki ukuran yang mendekati dengan marker pada ukuran 1500bp dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

Sekuensing DNA. Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif kemudian dilakukan sekuensing DNA.

Analisis Urutan DNA. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan BLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing dengan database yang tersedia pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov yang digunakan untuk mencari homologi sekuens nukleotida dengan sekuens database.

2.4 Analisis Data

Data hasil perhitungan nilai pH, pengukuran kepadatan sel dan pengukuran konsentrasi amonia disajikan dalam bentuk histogram. Kemudian hasil identifikasi isolat bakteri dengan analisis sekuensing berbasis gen 16S rRNA dibuat dalam bentuk pohon filogeni untuk memvisualisasikan kekerabatan menggunakan program MEGA-XI.