

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP**

**FAISAL
H041 19 1020**



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*



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

2023

LEMBAR PENGESAHAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP**

Disusun dan diajukan oleh:

FAISAL

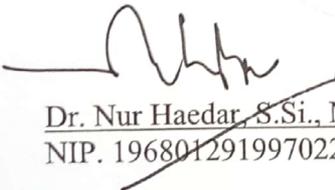
H041191020

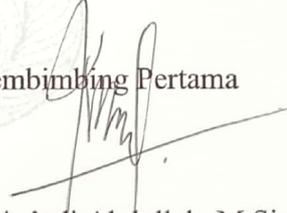
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 20 Maret 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

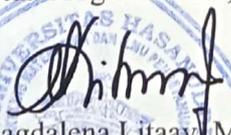
Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama


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


Drs. As'adi Abdullah, M.Si
NIP. 196203031989031007

Ketua Program Studi,


Dr. Magdalena Litaay, M.Sc
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Faisal
NIM : H041191020
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa tulisan saya berjudul

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan Prasejarah di Kawasan Karst Maros-Pangkep

Adalah karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 Maret 2023

Yang Menyatakan


Faisal

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim,

Assalamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah rabbil 'alamin, segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat rahmat, karunia, serta hidayah sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Identifikasi Bakteri Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan Prasejarah Di Kawasan Karst Maros-Pangkep**”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan studi di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan, motivasi dan doa dari berbagai pihak sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Pada kesempatan ini, saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih tak terhingga kepada keluarga khususnya kedua orang tua Bapak Mustamin dan Ibu Rosna serta saudara-saudara atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik berupa moril maupun material serta kiriman do'a yang selalu dihanturkan melalui sujud kepada penulis. Terima kasih karena telah menjadi motivator terkuat serta alasan utama penulis untuk menyelesaikan skripsi ini, semoga ini dapat menjadi salah satu pembuktian terindah dari penulis untuk keluarga.

Terima kasih sebesar-besarnya 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, atas segala motivasi yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan studi di perguruan tinggi dengan baik dan lancar. Terima kasih kepada pembimbing pertama Drs. As'adi Abdullah M.Si yang telah memberikan bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat selesai pada waktu yang tepat.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
4. Ibu Dr. Andi Masniawati, S.Si., M.Si. selaku dosen Penasehat Akademik (PA), terima kasih atas motivasi dan bimbingan yang diberikan kepada penulis hingga pada tahap penyusunan skripsi ini.
5. Tim penguji skripsi Bapak Dody Priosambodo, S.Si., M.Si. dan Ibu Mustika S.Si., S.Pd., M.Sc. terima kasih atas segala ilmu, saran dan dukungan yang diberikan kepada penulis hingga penyusunan skripsi saat ini.
6. 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 baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.

7. Kak Fuad Gani, S.Si, Kak Heriadi, S.Si, M.Si., Kak Nenis Sardiani, S.Si., Kak Syafrian, S.Si. yang telah banyak memberi bantuan terhadap penelitian ini baik ilmu, bimbingan, kritik dan saran yang sangat berguna bagi penulis.
8. Kak Donny Suherman, S.Si dan Kak Masykur, S.Si yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan skripsi penulis.
9. Teman Penelitian Nur Husnul Khotimah dan Zulfiqar Lukman yang telah menemani, mendukung dan bekerja sama dalam menyelesaikan penelitian.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2019, terima kasih atas doa, dukungan dan kerja sama yang diberikan selama perkuliahan.
11. 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 nikmat rahmat dan lindungan-Nya kepada kita semua, Aamiin.

Makassar, 20 Maret 2023

Penulis

ABSTRAK

Kerusakan lukisan prasejarah di kawasan karst Maros-Pangkep disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor biologis. Salah satu faktor biologis ialah adanya bakteri karbonoklastik yang dapat menghasilkan kalsium karbonat (CaCO_3) dan mengendap tepat pada bagian lukisan. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk memperoleh dan mengetahui jenis bakteri karbonoklastik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua yang berada di kawasan karst Maros-Pangkep. Isolasi dan seleksi bakteri karbonoklastik dilakukan dengan menggunakan medium *Calcium Carbonat Precipitation*. Uji potensi presipitat CaCO_3 dilakukan dengan menghitung massa presipitat CaCO_3 yang terbentuk serta analisa kadar amonia. Identifikasi bakteri dilakukan menggunakan marka molekuler gen 16S rRNA. Delapan belas isolat bakteri yang diperoleh dari sampel hasil swab di gua Parewe dan Bulu Sipong, 10 isolat positif termasuk ke dalam bakteri karbonoklastik. Hasil pengujian presipitat CaCO_3 diperoleh dua isolat yang memiliki kemampuan paling tinggi dalam menghasilkan presipitat CaCO_3 yaitu isolat Ps1-d menghasilkan presipitat sebesar 244,50 mg dengan nilai kadar amonia sebesar 946,2871 ppm serta isolat Ps8-b menghasilkan presipitat sebesar 179,50 mg dengan nilai kadar amonia sebesar 763,3654 ppm. Hasil identifikasi diketahui isolat Ps1-d termasuk jenis *Bacillus cereus* strain bk dan isolat Ps8-b termasuk jenis *Bacillus sp.* (in: Bacteria) NCCP-428.

Kata Kunci: Kerusakan Lukisan, Karst Maros-Pangkep, Bakteri Karbonoklastik.

ABSTRACT

Damage to prehistoric paintings in the Maros-Pangkep karst area is caused by several factors including biological factors. One of the biological factors is the presence of carbonoclastic bacteria that can produce calcium carbonate (CaCO_3) and precipitate right on the painting. The purpose of this study was to obtain and determine the types of carbonoclastic bacteria that cause damage to cave wall paintings in the Maros-Pangkep karst area. Isolation and selection of carbonoclastic bacteria were carried out using Calcium Carbonat Precipitation medium. The CaCO_3 precipitate potential test was carried out by calculating the mass of CaCO_3 precipitates formed and analyzing ammonia levels. Bacterial identification was performed using 16S rRNA gene molecular markers. Eighteen bacterial isolates obtained from swab samples in Parewe and Bulu Sipong caves, 10 positive isolates belonged to carbonoclastic bacteria. The results of CaCO_3 precipitate testing obtained two isolates that have the highest ability to produce CaCO_3 precipitates, namely isolate Ps1-d producing precipitates of 244.50 mg with ammonia content value of 946.2871 ppm and isolate Ps8-b producing precipitates of 179.50 mg with ammonia content value of 763.3654 ppm. The identification results showed that Ps1-d isolate belongs to *Bacillus cereus* strain bk and Ps8-b isolate belongs to *Bacillus* sp. (in: Bacteria) NCCP-428.

Keywords: Painting Damage, Maros-Pangkep Karst, Carbonoclastic Bacteria.

DAFTAR ISI

SAMPUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PRNYATAAN KEASLIAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	3
I.3 Manfaat Penelitian	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Kawasan Batuan Karst	5
II.2 Pembentukan Batuan Karst (Karstifikasi).....	6
II.3 Tipe Karst di Indonesia	8
II.4 Potensi Kawasan Batuan Karst.....	10
II.5 Kawasan Karst Maros-Pangkep	12
II.6 Faktor Penyebab Kerusakan Lukisan Pada Permukaan Batuan Karst ..	15

II.6.1 Faktor Lingkungan.....	15
II.6.2 Faktor Biologis.....	18
II.7 Identifikasi Bakteri	21
II.7.1 Karakteristik Morfologi	21
II.7.2 Sifat Biokimia dan Fisiologis.....	22
II.7.3 Identifikasi Berbasis Molekuler Gen 16S rRNA	23
II.8 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA.....	24
II.8.1 Ekstraksi DNA	24
II.8.2 Ampifikasi DNA dengan Metode PCR.....	26
II.8.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	28
II.8.4 Sekuensing DNA	29
II.8.5 Analisis Sekuens DNA	29
BAB III METODE PENELITIAN	31
III.1 Alat.....	31
III.2 Bahan.....	31
III.3 Prosedur Penelitian.....	32
III.3.1 Pengambilan Sampel	32
III.3.2 Sterilisasi Alat.....	32
III.3.3 Pembuatan Medium	33
III.3.4 Isolasi Bakteri Karbonoklastik	34
III.3.5 Seleksi Bakteri Karbonoklastik	34
III.3.6 Karakterisasi Bakteri Karbonoklastik.....	34
III.3.6.1 Pengamatan Morfologi Koloni.....	35

III.3.6.2 Pengamatan Morfologi Sel.....	35
III.3.6.3 Pengamatan Endospora	35
III.3.6.4 Uji Biokimia.....	36
III.3.7 Uji Potensi Presipitat CaCO ₃ Bakteri Karbonoklastik	37
III.3.7.1 Perhitungan Berat Presipitat.....	38
III.3.7.2 Analisa Kadar Amonia.....	38
III.3.7.3 Perhitungan Total Bakteri	39
III.3.8 Identifikasi Isolat Bakteri Karbonoklastik dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 16S rRNA	39
III.3.8.1 Ekstraksi DNA	39
III.3.8.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR.....	40
III.3.8.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	41
III.3.8.4 Sekuensing DNA.....	41
III.3.8.5 Analisis Urutan DNA.....	42
III.4 Analisis Data	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	43
IV.1 Lokasi Pengambilan Sampel.....	43
IV.2 Isolasi Bakteri Karbonoklastik.....	44
IV.3 Seleksi Bakteri Karbonoklastik.....	45
IV.4 Karakterisasi Bakteri Karbonoklastik	47
IV.4.1 Pengamatan Morfologi.....	47
IV.4.1.1 Pengamatan Morfologi Koloni	48
IV.4.1.2 Pengamatan Morfologi Sel	50

IV.4.2 Uji Biokimia	52
IV.4.2.1 Uji SIM (<i>Sulfide Indole Motility</i>).....	53
IV.4.2.2 Uji Sitrat.....	54
IV.4.2.3 Uji MR-VP (<i>Methyl Red Voges Proskauer</i>)	55
IV.4.2.4 Uji Katalase.....	57
IV.5 Uji Potensi Presipitat CaCO ₃ Bakteri Karbonoklastik	58
IV.5.1 Uji Presipitasi CaCO ₃	58
IV.5.2 Analisa Kadar Amonia	59
IV.5.3 Perhitungan Total Bakteri	61
IV.6 Analisis Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA.....	63
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	68
V.1 Kesimpulan	68
V.2 Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	77

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 Hasil Isolasi Bakteri	45
2 Hasil Seleksi Bakteri	46
3 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni dan Sel	48
4 Hasil Uji Biokimia	53
5 Hasil BLAST Isolat Bakteri Ps1-d dan Ps8-b	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Skema Proses Pelarutan Batu gamping.....	7
2 Peta Kawasan Karst Maros-Pangkep	13
3 Skema Prinsip Kerja PCR	26
4 Lokasi Pengambilan Sampel Bakteri Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan Prasejarah	43
5 Hasil Pengamatan Isolat Bakteri pada Medium <i>Calcium Carbonat Precipitation Agar</i>	47
6 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri	49
7 Hasil Pengamatan Morfologi Sel Bakteri	51
8 Hasil Pengamatan Endospora Isolat Bakteri Ps1-d.....	52
9 Hasil Uji SIM Bakteri Karbonoklastik.....	53
10 Hasil Uji Sitrat Bakteri Karbonoklastik	55
11 Hasil Uji <i>Methyl Red</i> Bakteri Karbonoklastik	56
12 Hasil Uji <i>Voges Proskauer</i> Bakteri Karbonoklastik	56
13 Hasil Uji Katalase Bakteri Karbonoklastik	58
14 Hasil Perhitungan Berat Presipitat CaCO_3	59
15 Hasil Perhitungan Kadar Ammonia Bakteri Karbonoklastik.....	60
16 Hasil Perhitungan Total Bakteri Asal Gua Parewe	61
17 Hasil Perhitungan Total Bakteri Asal Gua Bulu Sipong.....	62
18 Hasil Amplifikasi Gen 16 rRNA dengan Primer 63F dan 1387R.....	65
19 Filogeni dengan Metode UPGMA Terhadap Isolat Ps1-d dan Ps8-b	67

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Halaman
1 Skema Kerja Penelitian	77
2 Skema Kerja Pengambilan Sampel, Isolasi dan Seleksi Bakteri Karbonoklastik	78
3 Skema Kerja Uji Presipitat CaCO_3 yang dihasilkan Bakteri Karbonoklastik	79
4 Skema Kerja Uji Kadar Amonia yang dihasilkan Bakteri Karbonoklastik	80
5 Skema Kerja Ekstraksi DNA Bakteri.....	81
6 Skema Kerja Amplifikasi DNA dengan PCR	82
7 Skema Kerja Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	83
8 Tempat Pengambilan Sampel.....	84
9 Pengambilan Sampel.....	84
10 Hasil Seleksi Bakteri Karbonoklastik	85
11 Uji Potensi Presipitat CaCO_3 oleh Bakteri Karbonoklastik	86
12 Presipitat yang Dihasilkan oleh Bakteri Karbonoklastik	87
13 Hasil Perhitungan Berat Presipitat CaCO_3	88
14 Hasil Perhitungan Kadar Analisa Amonia	89
15 Hasil Karakterisasi Isolat Bakteri Karbonoklastik.....	90
16 Hasil Elektroforesis Gen 16 rRNA	91
17 Identifikasi Jenis Bakteri Menggunakan Marka Molekuler.....	92
18 Foto Prosedur Penelitian	94

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kawasan karst di permukaan bumi berkisar 25%, termasuk kawasan Indonesia yang memiliki bentang alam karst tersebar hampir di seluruh wilayah dengan luas mencapai 15 juta hektar (Irianto *et al.*, 2020). Karst atau batu gamping adalah kawasan unik yang ditandai dengan kawasan tandus, tanah berbatu, gua, sungai bawah tanah, dan tidak adanya lubang. Hal ini terjadi akibat dari efek pelarutan yang terjadi di bawah tanah. Bentang alam karst terbentuk oleh aksi geologis air pada batuan terlarut seperti karbonat, gipsum, batu gamping dan dolomit, didominasi oleh pencairan dan terbentuk bersamaan dengan fenomena erosi atau runtuh air dan beberapa non-karbonat larut sebagian seperti kuarsit dan batu pasir silika (Zhou *et al.*, 2020; Masilela *et al.*, 2022).

Karst merupakan bentang alam yang unik dan langka, disebut demikian karena proses pembentukan kawasan ini memakan waktu yang cukup lama dan hanya terdapat di daerah-daerah tertentu saja. Hal ini membuat kawasan karst menjadi sasaran eksplorasi dan eksploitasi oleh manusia (Suhartono, 2012). Potensi inklusi di kawasan karst diakui secara luas oleh para ahli geologi dan speleologi, bahkan di tingkat internasional. Potensi yang ada sangat beragam diantaranya adalah museum dimana gua-gua di kawasan karst merekam berbagai peristiwa sejarah dan prasejarah. Wilayah karst yang memiliki potensi dan banyak situs warisan budaya telah dinobatkan sebagai Situs Warisan Dunia (World Heritage

Site) di bawah naungan UNESCO (Mulyadi, 2016). Salah satu warisan budaya kawasan karst adalah lukisan prasejarah yang terdapat pada dinding gua (Suhartono, 2012). Pada zaman prasejarah, manusia menggunakan dinding gua tidak hanya sebagai tempat tinggal, tetapi sebagai media untuk mengungkapkan pengalaman, perjuangan, dan harapan hidup manusia dalam bentuk lukisan (Linda, 2005). Mengingat rentang waktu yang sudah begitu lama menyebabkan banyaknya lukisan mulai mengalami kerusakan dan terancam punah (Habibi *et al.*, 2020). Kerusakan tersebut disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain akibat proses alam maupun pelapukan pada batuan. Proses pelapukan disebabkan oleh cuaca atau iklim antara musim hujan dan kemarau yang diikuti oleh perusakan secara kimiawi (Permana *et al.*, 2019). Menurut Mulyadi (2016) kerusakan lukisan pada dinding gua disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya pelapukan fisik (retak, pecah, aus), pelapukan kimia (salinisasi, sementasi), serta faktor alam dan manusia. Selain itu, kerusakan juga disebabkan oleh aktivitas manusia seperti pemukiman, pertanian, pariwisata dan industri.

Selain pengaruh lingkungan, kerusakan lukisan juga disebabkan oleh faktor biologis yaitu keberadaan mikroorganisme. Gua adalah salah satu ekosistem yang ditandai dengan lingkungan yang gelap, dan ketersediaan suhu, oksigen, dan energi yang fluktuatif menjadikan kondisi ini sebagai habitat unik bagi mikroorganisme. (Barton & Northup, 2007). Beberapa penelitian menunjukkan hasil yang sangat menarik dan mengejutkan dengan ditemukan banyaknya jenis mikroorganisme di kawasan karst (Mubarak *et al.*, 2017). Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa ditemukan kelompok mikroorganisme yang diisolasi dari ornamen gua kapur. Salah satu kelompok mikroorganisme tersebut adalah bakteri karbonoklastik yang

memiliki kemampuan dalam membentuk endapan (presipitasi) karbonat pada batuan karst (Febria *et al.*, 2015; Habibi *et al.*, 2020). Endapan karbonat dapat menutupi lukisan apabila proses pengendapan tepat terjadi di permukaan lukisan. Sekitar 50% proses pengendapan pada permukaan batuan karst terjadi karena keberadaan bakteri karbonoklastik (Sarayu *et al.*, 2014).

Kelompok bakteri yang dapat mengendapkan kalsium karbonat (CaCO_3) antara lain *Bacillus magaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sp.*, *Brevibacillus brevis*, dan *Pasteurella sp.* (Cacchio *et al.*, 2003; Komala dan Khun, 2003). Proses pengendapan kalsium karbonat (CaCO_3) oleh bakteri ini terjadi melalui hidrolisis urea yang dipengaruhi oleh aktivitas enzim urease yang dihasilkan oleh bakteri (Dhami *et al.*, 2014). Kajian mengenai hubungan antara kerusakan lukisan prasejarah yang terdapat pada dinding gua karst dengan faktor biologis berupa keberadaan bakteri karbonoklastik masih sangat kurang. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui jenis bakteri karbonoklastik penyebab kerusakan lukisan pada dinding gua kawasan karst Maros-Pangkep.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat bakteri karbonoklastik yang berasal dari batuan karst Maros-Pangkep
2. Mengetahui jenis bakteri karbonoklastik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua yang berada di kawasan karst Maros-Pangkep

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait jenis bakteri yang dapat menyebabkan kerusakan pada lukisan yang terdapat pada dinding gua kawasan karst Maros-Pangkep.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 - Februari 2023. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar lukisan batu pada kawasan karst Maros-Pangkep. Isolasi dan seleksi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, identifikasi dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kawasan Batuan Karst

Istilah Karst berasal dari Karst (bahasa Jerman) yang berarti Lahan Gersang. Karst pertama kali diperkenalkan oleh Cvijic (1893) untuk mendeskripsikan plato daerah di laut Adriatic Yugoslavia. Karst merupakan proses pelarutan batuan yang berhubungan dengan proses pelapukan batuan dan sumbangannya ke pengurangan massa batuan/tanah, khususnya dalam proses akhir dari siklus fluvial. Pada daerah tertentu pelarutan menjadi suatu proses dominan pada perkembangan landform. Pada perkembangan selanjutnya istilah tersebut digunakan untuk menjelaskan suatu lahan yang mempunyai pola drainase khas yang dikontrol oleh pelarutan. Kemudian istilah tersebut dipersempit oleh Summerfield, 1970 dalam Sweetings, 1973 menjadi daerah dengan batu gamping yang memiliki sistem drainase yang jarang, solum tanah tipis dan keberadaannya hanya pada beberapa tempat, cekungan tertutup dan sistem drainase bawah permukaan (Irianto, 2020).

Berdasarkan pengertian dalam ketentuan umum Kepmen ESDM Nomor 17 Tahun 2012 tentang Penetapan Kawasan Bentang Alam Karst disebutkan bahwa yang dimaksud karst adalah bentang alam yang terbentuk karena pelarutan air pada batu gamping dan/atau dolomit. Pengertian kawasan bentang alam karst adalah karst yang menunjukkan eksokarts dan endokarts tertentu. Eksokarst merupakan karst pada bagian permukaan sedang endokarst merupakan karst pada bagian bawah

permukaan. Eksokarst terdiri dari mata air permanen, bukit karst, dolina, uvala, polje dan telaga. Endokarst terdiri dari sungai bawah tanah dan speleotem.

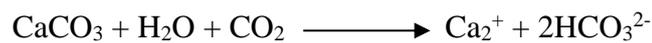
Karst atau batu gamping adalah kawasan unik yang ditandai dengan kawasan tandus, tanah berbatu, gua, sungai bawah tanah, dan tidak adanya lubang. Hal ini terjadi akibat dari efek pelarutan yang terjadi di bawah tanah. Bentang alam karst terbentuk oleh aksi geologis air pada batuan terlarut seperti karbonat, gipsum, batu gamping dan dolomit, didominasi oleh pencairan dan terbentuk bersamaan dengan fenomena erosi atau runtuh air (Zhou *et al.*, 2020).

Batu gamping yaitu batuan endapan yang terbentuk di dasar lautan dan disusun oleh berbagai cangkang binatang laut dalam kurun waktu jutaan tahun (Haryono & Adji, 2017). Melalui proses geologi, akhirnya endapan batu gamping tersebut terangkat ke permukaan laut dan membentuk dataran atau pegunungan batu gamping. Selanjutnya dengan adanya kontak antara air atau air hujan yang mengandung senyawa CO₂ dengan batu gamping tersebut, terjadilah proses kimiawi hingga membentuk rongga berbagai bentuk dan ukuran dalam kurun waktu ribuan tahun atau lebih. Endapan batu gamping yang telah mengalami proses semacam ini disebut batu gamping/Karst.

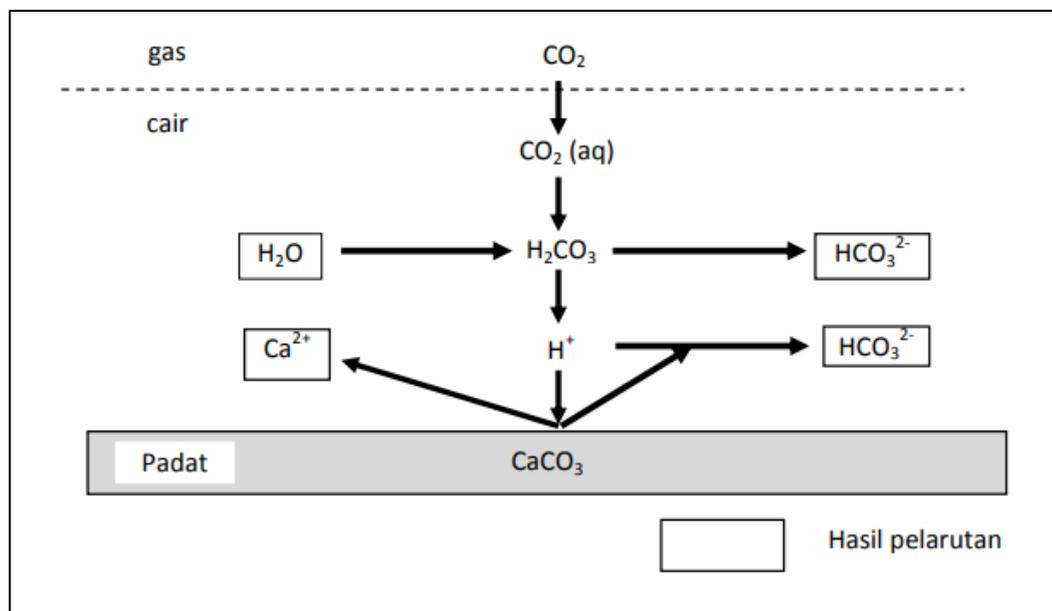
II.2 Pembentukan Batuan Karst (Karstifikasi)

Karstifikasi adalah proses pelarutan, proses korosi batuan secara kimia oleh air pada batuan gamping, gipsum, batu garam atau batuan lain yang mudah larut sehingga membentuk fenomena karst baik di permukaan maupun bawah permukaan bumi. Karstifikasi atau proses pembentukan lahan karst didominasi oleh proses pelarutan (Veress, 2020). Proses karstifikasi sangat tergantung dengan

keberadaan lapisan epikarst karena kemampuan meloloskan air batuan gamping rendah, sehingga dibutuhkan suatu lapisan penyimpan air yang berguna untuk menampung air selama belum terloloskan di dalam batuan gamping. Setelah air melewati pori-pori batuan gamping, maka proses karstifikasi baru akan dimulai (Cahyadi, 2017). Proses pelarutan batu gamping diawali oleh larutnya CO₂ di dalam air membentuk H₂CO₃. Larutan H₂CO₃ tidak stabil terurai menjadi H⁺ dan HCO₃²⁻. Ion H⁺ inilah yang selanjutnya menguraikan CaCO₃ menjadi Ca²⁺ dan HCO₃²⁻. Secara ringkas proses pelarutan dirumuskan dengan reaksi sebagai berikut (Utama *et al.*, 2016):



Proses pelarutan batu gamping oleh (Haryono & Adji, 2017) sebagaimana dalam gambar di bawah ini:



Gambar 1. Skema Proses Pelarutan Batu gamping (Haryono & Adji, 2004).

Pelarutan batu gamping terjadi karena adanya hujan asam di suatu daerah yang mengandung batu gamping sehingga terjadi proses pelarutan pada batu

gamping tersebut dan akan menghasilkan larutan gamping (CaCO_3) dengan kepekatan tertentu sesuai dengan kepekatan hujan asam. Larutan gamping tersebut suatu saat akan mengalami kristalisasi dan presipitasi menjadi bentukan-bentukan endokarst dan eksokarst (Sulistyorini, 2014).

Semakin pekat air larutan CaCO_3 hasil pelarutan yang terbentuk, semakin mudah terbentuknya endokarst dan eksokarst di pebukitan batu gamping. Apabila kepekatan larutan rendah atau tidak terjadi lagi pelarutan, maka tidak akan terjadi endokarst dan eksokarst, artinya proses karstifikasi tidak aktif atau untuk sementara berhenti hingga tersedia kembali larutan asam yang pekat yang berasal dari hujan asam (Sulistyorini, 2014).

II.3 Tipe Karst di Indonesia

Sebagian besar kawasan karst di Indonesia tersusun oleh batuan karbonat (CO_3), dan hampir tidak ada yang tersusun oleh batuan lain seperti gipsum, batu garam, maupun batuan evaporit. Hampir di setiap pulau di Indonesia memiliki batuan karbonat, tapi tidak semuanya terkarstifikasi menjadi kawasan karst. Berikut adalah klasifikasi tipe – tipe karst yang ada di Indonesia (Utama *et al.*, 2016):

1. Tipe Gunung Sewu

Tipe ini hadir berupa kawasan karst yang luas dan dicirikan bukit gamping berbentuk kerucut (konikal) dan kubah yang jumlahnya ribuan. Selain itu didapati adanya lembah dolin dan polje diantara bukit-bukit tersebut. Di dalam dolin didapati adanya terrarosa yang menahan air sehingga tidak bocor ke dalam tanah. Sungai-sungai yang mengalir di bawah tanah akan bergabung membentuk sistem besar. Arah aliran sungai umumnya dikendalikan oleh

struktur geologi. Tipe ini berkembang di sepanjang jalur pegunungan selatan dari Jawa Timur hingga Yogyakarta.

2. Tipe Gombang

Bentang alam karst dicirikan oleh pembentukan cockpit, terutama yang dijumpai di daerah Selatan Gombang (daerah Karangbolong). Bentukan depresi yang ada umumnya dibatasi oleh lereng yang terjal dan kadang dijumpai bentukan seperti bintang. Karena batu gamping berada di atas lapisan batuan yang kedap air maka batas antara keduanya menjadi tempat keluarnya mata air.

3. Tipe Wawolesea

Tipe ini dicirikan adanya lorong-lorong yang terisi oleh air panas dan di beberapa tempat terdapat jembatan alam (natural bridge). Tipe ini dicirikan terutama oleh kontrol hidrologi air panas sehingga terjadi proses pengendapan ulang larutan kalsit yang membentuk undak travertin yang beraneka ragam serta jarang dijumpai di tempat lain.

4. Tipe Sema

Tipe ini merupakan tipe kawasan karst yang melibatkan batu gamping yang berumur muda (kala kwarter). Bentang alam yang dijumpai berupa surupan (sink) dan lorong-lorong gua yang pendek. Undak-undak pantai yang disusun oleh koral dapat mencapai tebal 25-100 meter dan mengalami pengangkatan 2,5 cm/tahun. Tipe Sema dijumpai pada Pulau Sema sebelah Barat Kupang, NTT.

5. Tipe Nusa Penida

Pulau Nusa Penida yang terletak di sebelah Selatan Pulau Bali memiliki kawasan karst yang tersusun atas batu gamping klastik dan nonklastik. Pada batu gamping klastik terdapat sisipan batuan berukuran halus dan kedap air. Adanya perulangan jenis batuan menyebabkan terjadi keluaran air tanah yang bertingkat.

6. Tipe Irian

Berdasarkan informasi yang ada, tipe karst di Irian dicirikan oleh adanya gua-gua panjang. Karst disusun oleh batu gamping klastik dan bioklastik, bahkan telah berubah menjadi metasedimen akibat kontak dengan intrusi batuan beku.

7. Tipe Maros

Tipe ini dicirikan oleh bukit-bukit yang berbentuk menara (tower karst atau mogote). Pembentukan bentang alam ini berkaitan dengan bidang retakan (kekar dan sesar) yang arahnya berkedudukan tegak atau hampir tegak. Tinggi menara antara 50-200 meter, berlereng terjal, dan datar pada bagian puncaknya. Di antara bukit-bukit tersebut terdapat lembah-lembah sempit, berdasar rata, dan berbentuk memanjang. Bentuk yang khas ini dijumpai di daerah Maros, Sulawesi Selatan.

II.4 Potensi Kawasan Batuan Karst

Kawasan karst merupakan bentang alam yang unik dan langka. Disebut demikian karena proses pembentukan kawasan ini memakan waktu yang cukup lama dan hanya terdapat di daerah-daerah tertentu saja. Hal ini membuat kawasan karst menjadi sasaran eksplorasi dan eksploitasi oleh manusia yang tidak pernah

puas (Suhartono, 2012). Kawasan karst dapat menjadi obyek kajian yang menarik bagi berbagai disiplin ilmu antara lain: geologi, geomorfologi, hidrologi, biologi, arkeologi dan karstologi. Masing-masing disiplin ilmu tersebut mempunyai ketertarikan terhadap kawasan karst karena kandungan fenomenanya sangat berbeda dengan kawasan lain di permukaan bumi ini. Fenomena abiotik, biotik di atas permukaan dan di bawah permukaan kawasan karst masih belum banyak yang terungkap. Kawasan karst masih mengandung berbagai tantangan ilmiah dari berbagai sudut ilmu pengetahuan.

Potensi pada kawasan karst sudah banyak dilontarkan para geolog maupun speolog bahkan di tingkat internasional. Sudah sejak tahun 1993, dalam kongres International Union of Speology di Beijing, secara aklamasi memutuskan untuk merekomendasikan kawasan karst Indonesia sebagai Situs Warisan Dunia (World Heritage Site) di bawah naungan UNESCO (Mulyadi, 2016). Potensi yang terkandung amat beragam mulai dari arkeologi dimana gua-gua yang terdapat di kawasan karst merupakan museum yang merekam berbagai kejadian sejarah maupun prasejarah seperti gambar cadas (lukisan di dinding gua).

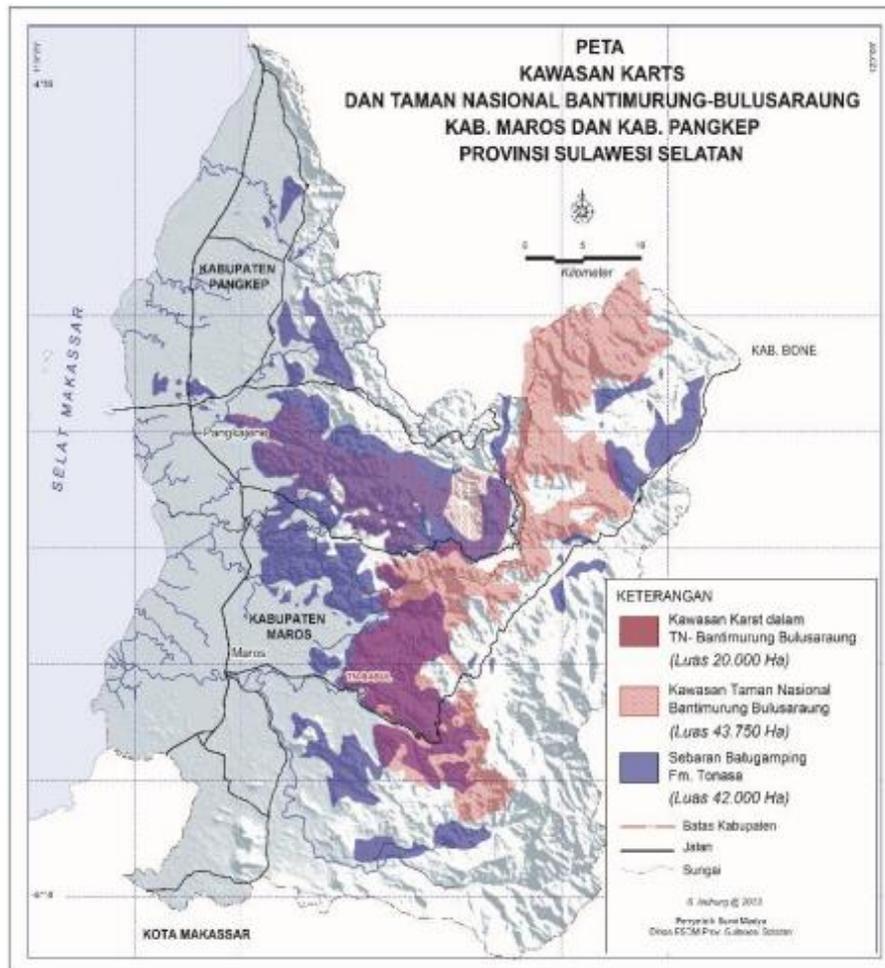
Lukisan prasejarah merupakan jejak budaya yang bersifat universal karena ditemukan hampir di seluruh dunia, baik di Afrika, Eropa, Asia, maupun Australia. Temuan lukisan itu umumnya berupa cap telapak tangan, binatang, manusia, geometris, abstrak, dan sebagainya. Di Indonesia lukisan prasejarah terbanyak ditemukan di Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Kalimantan Timur, Maluku, dan Papua Barat (Permana 2008; Permana 2014). Gambar-gambar yang terdapat pada gua prasejarah memberikan bukti tentang adanya kegiatan hidup manusia di dalam gua pada masa prasejarah. Meskipun bentuk dan fungsi dari lukisan masih

banyak yang belum jelas, namun gambar-gambar tersebut bukan tanpa makna (Bray 1970). Bukti budaya lukisan tersebut menunjukkan tentang keberadaan manusia pendukungnya yang telah menetap di tempat tersebut. Selain sebagai tempat tinggal, dinding-dinding gua digunakan sebagai media untuk mengekspresikan pengalaman, perjuangan dan harapan hidup manusia dalam bentuk lukisan gua (Linda, 2005). Seni lukis pertama kali lahir ketika manusia mulai diliputi oleh rasa iseng dan juga rasa takut terhadap lingkungannya, lebih-lebih setelah mereka tinggal di dalam gua atau ceruk. Rasa iseng tersebut diduga diawali dengan usaha meniru bekas garutan kuku binatang pada dinding gua atau ceruk, yang kemudian tanpa disadari telah menghasilkan bentuk-bentuk yang dikehendaki, antara lain model binatang dan bayangan tangan atau cap tangan. Bentuk-bentuk tersebut dianggap sebagai asal mula lukisan. Selain itu penggambaran garis-garis imajinasi dalam bentuk binatang menunjukkan bahwa si pelukis atau si pemburu pada waktu itu mulai tergerak hatinya oleh dorongan rasa yang artistik (Kosasih, 1987). Jejak budaya itu juga menandakan bahwa manusia telah memasuki babak baru dengan meninggalkan kebiasaan hidup berpindah-pindah (nomaden), dan memasuki tahapan kehidupan menetap pada gua atau ceruk (Soejono & Leirissa, 2009; Suhartono, 2012).

II.5 Kawasan Karst Maros-Pangkep

Provinsi Sulawesi Selatan memiliki fenomena eksokars dan endokars yang menakjubkan dan dianggap paling lengkap di Indonesia, itulah kawasan kars Maros-Pangkep. Gugusan bukit-bukit batu gamping ini menempati bagian tengah daerah Maros menyebar ke utara hingga daerah Pangkep. Sebaran perbukitan batu

gamping Maros-Pangkep, menempati lahan sekitar 42.000 hektare. Posisi geografis kawasan ini terletak antara 119° 34' 17" – 119° 55' 13" Bujur Timur dan antara 4° 42' 49" – 5° 06' 42" Lintang Selatan. Secara administratif berada dalam wilayah Kabupaten Maros dan Kabupaten Pangkep (Nuhung, 2016).



Gambar 2. Peta Kawasan Karst Maros-Pangkep (Nuhung, 2016).

Kawasan karst Maros-Pangkep atau yang dikenal juga sebagai “Hutan Batu” ini berlokasi di Taman Nasional Bantimurung, Pegunungan Bulusaraung. Ciri khas dari kawasan karst ini yaitu bentuk karstnya yang berupa menara atau dalam istilah geologis disebut tower karst. Dengan luas mencapai 43.750 hektar, Maros-Pangkep menyandang predikat “hutan batu” karst terluas kedua di dunia,

setelah China. Luas tersebut mencakup 20.000 hektar area pertambangan, dan 23.750 hektar area konservasi Taman Nasional Bantimurung Bulusaraung (Riza *et al.*, 2014).

Saat ini kawasan karst Maros-Pangkep sedang dalam proses penetapan menjadi kawasan warisan dunia oleh UNESCO. Umumnya kawasan ini dan kawasan karst lainnya secara ekonomi dikenal sebagai kawasan yang memiliki potensi bahan galian tambang untuk bahan bangunan, marmer dan bahan baku semen. Selain potensi tambang kawasan ini juga memiliki potensi ekonomi lain yang tidak kalah penting, yaitu nilai jasa lingkungan (*environmental services*) seperti sumberdaya air, keanekaragaman hayati, keunikan bentang alam, obyek wisata alam, dan potensi tinggalan sejarah dan purbakala berupa situs gua prasejarah. Mengacu pada data tahun 2012, terdapat 126 gua prasejarah di Kawasan Karst Maros Pangkep, 78 diantaranya memiliki tinggalan berupa lukisan gua prasejarah, dengan beragam bentuk dan jenis gambar. Keberadaan gua prasejarah tersebut yang menjadikan kawasan karst ini dikenal dengan kawasan gua prasejarah Maros-Pangkep, yang saat ini sementara dalam proses penetapan sebagai Kawasan Cagar Budaya Gua Prasejarah Maros-Pangkep (Mulyadi, 2016). Menurut H.R. Van Hekeren (1972 dalam Suhartono 2012) kemungkinan besar kehidupan gua di Sulawesi Selatan berlangsung sejak pertengahan atau penghujung kala Pleistosen akhir yakni sekitar 50.000 hingga 30.000 tahun sebelum Masehi.

Penelitian terakhir lukisan prasejarah di Indonesia dilakukan di Maros (Sulawesi Selatan) tahun 2019 yang menunjukkan bahwa di Situs Bulu Sipong teridentifikasi berasal dari sekitar 44 ribu tahun lalu. Motif gambar cadas itu melukiskan adegan perburuan binatang dan gambaran *therianthrope* (makhluk

setengah manusia dan setengah hewan) tertua di dunia (Aubert dkk 2019). Hasil yang menggembirakan itu merupakan penegasan dari penelitian sebelumnya tahun 2014 telah menyimpulkan bahwa gambar cadas di Maros tertua di dunia. Bukti gambar cadas tertua itu terdapat di Situs Gua Timpuseng berupa motif cap telapak tangan tertua dari gua Timpuseng berasal dari 39.900 tahun, dan gambar babi rusa berasal dari 35.400 tahun (Aubert dkk 2014). Kedua hasil penelitian itu membuktikan bahwa gambar cadas dari Maros lebih tua dibandingkan dengan gua El Castillo (Spanyol) yang selama ini dianggap tertua (Habibi *et al.*, 2020).

Setelah ribuan tahun ditinggalkan, kini lukisan dinding gua di Kabupaten Maros dan Pangkep telah banyak mengalami kerusakan karena proses pelapukan dan pengelupasan kulit batuan terus berlanjut. Lukisan pada dinding gua prasejarah umumnya mengalami kerusakan yang sama, selain terjadi pengelupasan juga terjadi retakan mikro dan makro. Di samping itu di beberapa tempat warna lukisan memudar terutama lukisan yang terletak di bagian dinding depan mulut gua. Demikian pula proses inkrostasi (pengendapan kapur) terus berlanjut, hampir semua gua terjadi proses pengendapan kapur pada kulit batuan gua, coretan spidol dan goresan benda tajam juga banyak dijumpai (Suhartono, 2012).

II.6 Faktor Penyebab Kerusakan Lukisan pada Permukaan Batuan Karst

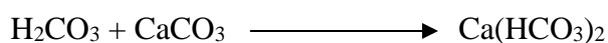
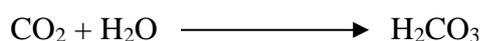
II.6.1 Faktor Lingkungan

Keberadaan tinggalan purbakala di gua-gua prasejarah tersebut, khususnya yang berupa lukisan gua makin lama kondisinya makin mengkhawatirkan. Saat ini telah banyak lukisan gua prasejarah yang mengalami kerusakan, salah satunya karena letak gua-gua prasejarah yang berada di alam terbuka sangat rentan

terpengaruh oleh faktor lingkungan/alam sekitarnya. Faktor cuaca dan iklim merupakan pengaruh yang dominan terhadap kerusakan dan pelapukan dinding gua dan lukisannya yang selanjutnya dapat menjadi ancaman bagi keselamatan dan keberadaan lukisan tersebut (Mulyadi, 2016).

Pada musim hujan mulut gua yang tidak terlindungi akan terkena air hujan secara terus menerus. Air hujan dapat bersifat asam karena karbon dioksida atmosfer larut dalam air hujan menghasilkan asam karbonat. Dalam lingkungan tidak tercemar, pH air hujan sekitar 5,6. Pada kondisi tertentu, hujan asam terjadi jika gas seperti sulfur dioksida dan nitrogen oksida ada dalam atmosfer. Oksida ini dalam air hujan menghasilkan asam kuat dan menurunkan pH sampai 4,5 atau 3,0. Sulfur dioksida ini dapat berasal dari lingkungan yang tercemar akibat gas buangan dari kendaraan bermotor. Air hujan yang bersifat asam ini dapat menyebabkan pelapukan pada lapisan luar/permukaan batuan yang terkena (Suhartono, 2012). Salah satu proses pelapukan larutan yang paling dikenal adalah karbonasi, proses di mana karbon dioksida atmosfer mengacu pada pelapukan larutan. Karbonasi terjadi pada batuan yang mengandung kalsium karbonat seperti batuan kapur/karst. Hal ini terjadi apabila karbon dioksida atau asam organik membentuk asam karbonat lemah yang bereaksi dengan kalsium karbonat (batuan kapur) dan membentuk kalsium bikarbonat (Suhartono, 2012).

Reaksi itu adalah sebagai berikut:



Karbonasi pada permukaan batuan batu retak menyerupai sumuran menghasilkan pavement batuan kapur diskret yang paling efektif memperlebar serta

memperdalam retakan. Air, yang bereaksi dengan karbon dioksida dapat membentuk asam karbonat, mengalir melewati permukaan batuan yang ada lukisan dapat menyebabkan kerusakan lukisan. Karbon dioksida, dalam bentuk asam karbonat, jika bercampur dengan mineral batuan dapat menyerang feldspar dan mineral lainnya mengakibatkan silika dan kalium-natrium karbonat menjadi terlarut dan terbawa oleh aliran air sehingga lukisan dapat terkelupas. Di samping itu, apabila aliran air yang mengandung garam terlarut melewati lukisan jika berada di udara terbuka atau suhu atmosfer tinggi mengakibatkan terjadinya pengendapan dan dapat menutupi lukisan (Suhartono *et al.*, 2009).

Pada musim penghujan, permukaan batuan akan mengalami pelapukan kimia dan biologi yang disertai pembentukan lapisan lumut dan lapisan hasil pelapukan kimia. Pada musim kemarau permukaan tersebut akan terpapar sinar matahari secara terus menerus mengakibatkan terjadinya penguapan air dan tumbuhan pada permukaan batuan akan mati. Tumbuhan mati ini akan meninggalkan lapisan yang berwarna hijau kehitaman pada permukaan batuan. Peluruhan dari tumbuhan mati dalam lapisan batuan dapat membentuk asam organik yang, jika larut dalam air (pada musim penghujan berikutnya), menyebabkan pelapukan kimia. Pelepasan senyawa kelat dapat secara mudah mempengaruhi batuan yang ada di sekitarnya, dan dapat menyebabkan leaching lapisan batuan yang hebat yang mengakibatkan terjadinya pengelupasan lapisan permukaan (Suhartono *et al.*, 2009).

Lapisan kalsium bikarbonat ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) yang terjadi pada musim penghujan akan mengalami dekomposisi menghasilkan lapisan kalsium oksida pada musim kemarau karena terjadinya pelepasan air. $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2 \rightarrow \text{CaO}(\text{s}) +$

$\text{H}_2\text{O}(\text{g}) + 2\text{CO}_2(\text{g})$. Lapisan kalsium oksida ini sangat rapuh dan mudah mengelupas sehingga pada mulut gua yang terbuka kemudiain terkena sinar matahari dan hujan secara terus menerus akan mengalami pengelupasan yang sangat cepat (Suhartono *et al.*, 2009).

Selain faktor air, angin yang mengandung ion-ion garam (salt weathering) yang berasal dari penguapan air laut yang terletak berhadapan dengan lubang gua juga berperan dalam mempercepat pengelupasan. Hal ini terlihat dari kenampakan di beberapa dinding gua, dimana lukisan yang terkena hembusan langsung angin mengalami pengelupasan secara intensif, sedangkan yang terhalang tidak mengalami pengelupasan, misalnya pada gua Jari E dan Gua Burung. Menurut Doehne (2002), kerusakan permukaan yang disebabkan oleh aktivitas garam dapat berupa pengerakan permukaan (surface scaling), retakan dalam (deep cracking), mengembang, disintegrasi butiran (granular disintegration), pembubukan bagian permukaan (surface powdering), dan retakan mikro (microcracking).

II.6.2 Faktor Biologis

Gua adalah salah satu ekosistem yang ditandai dengan lingkungan yang gelap, dan ketersediaan suhu, oksigen, dan energi yang fluktuatif menjadikan kondisi ini sebagai habitat unik bagi mikroorganisme. (Barton & Northup, 2007). Pada umumnya struktur komunitas mikroorganismenya di dalam gua agak cenderung stabil (Alonso *et al.*, 2018), akan tetapi bisa berubah-ubah tergantung pada kondisi lokal termasuk tipe dan heterogenitas mineral dan bahan organik pada permukaan batuan, serta faktor fisika dan kimia lainnya termasuk pH dan ketersediaan nutrisi. Studi yang telah dilakukan di berbagai gua, khususnya yang menggunakan metode tanpa mengkultur bakteri, telah mengindikasikan bahwa bahwa komunitas bakteri

didominasi oleh Proteobacteria dan Actinobacteria (Cañaveras *et al.*, 2001; Saiz-Jimenez, 2012). Proteobacteria pada umumnya ditemukan dengan kelimpahan tinggi, yang diasosiasikan dengan kemampuannya untuk mendegradasi berbagai macam material organik, sementara Actinobacteria terlibat dalam proses biomineralisasi (Tomczyk-Żak & Zielenkiewicz, 2016). Beberapa kelompok bakteri juga telah teridentifikasi melalui high-throughput sequencing termasuk Acidobacteria, Firmicutes, Nitrospirae, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia dan Cyanobacteria. Anggota dari kelompok bakteri yang berperan penting dalam proses kolonisasi dinding gua tidak ditemukan jika hanya menggunakan metode konvensional dengan mengandalkan kultivasi pada skala lab (Tomczyk-Żak & Zielenkiewicz, 2016). Berbagai jenis bakteri yang disebutkan merupakan kelompok bakteri yang ditemukan melimpah di banyak gua di Australia, Cina, Spanyol dan Amerika Serikat (Barton & Jurado, 2007; Bastian & Alabouvette, 2009; Adetutu *et al.*, 2012; Ortiz *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2016). Beberapa penelitian menunjukkan hasil yang sangat menarik dan mengejutkan dengan ditemukannya banyak mikroba di kawasan karst (Mubarak *et al.*, 2017).

Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa ditemukan habitat mikroba yang diisolasi dari ornamen gua kapur. Mikroba tersebut diketahui dapat membentuk dan mengendapkan kalsium karbonat (Febria *et al.*, 2015). Salah satu mikroba yang dapat merusak lukisan adalah bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk endapan (presipitasi) pada batuan karst (Habibi *et al.*, 2020). Endapan karbonat dapat menutupi lukisan apabila proses pengendapan tepat terjadi di lukisan. Pengendapan mineral karbonat 50% dilakukan oleh bakteri tertentu (Sarayu *et al.*, 2014). Pengendapan CaCO_3 oleh bakteri ini terjadi melalui hidrolisis

urea yang dipengaruhi oleh aktivitas enzim urease (Dhami *et al.*, 2014). Bakteri yang dapat menghidrolisis urea dan mengendapkan kalsium karbonat (CaCO_3) antara lain *Bacillus magaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* sp., *Brevibacillus brevis*, dan *Pasteurella* sp. (Cacchio *et al.*, 2003; Komala dan Khun, 2003).

Permukaan sel bakteri biasanya bermuatan negatif sehingga dapat mengikat kation divalen seperti Ca^{2+} dan Mg^{2+} . (Zhang *et al.* 2018). Lebih khusus lagi, mekanisme pengendapan dimulai dengan hidrolisis urea yang akan menghasilkan asam karbamat dan amonia. Dekomposisi alami asam karbamat menghasilkan asam karbonat dan amonia. Keseimbangan amonia dan asam karbonat dalam bentuk terprotonasi dan terdeprotonasi dalam medium cair dapat mengubah pH. Faktanya, pembentukan amonia dapat meningkatkan pH menjadi 9,2 sehingga mendorong biomineralisasi kalsium karbonat. [Krajewska, 2018; Seifan *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019]. Selanjutnya reaksi berlanjut menuju pengendapan kalsium karbonat dengan mengikat ion Ca^{2+} ke permukaan sel bakteri. Konsentrasi tinggi ion karbonat dan kalsium pada permukaan bakteri bertindak sebagai tempat nukleasi dan mendorong pengendapan kalsium karbonat (Ortega-Villamagua, E., Gudiño-Gomezjurado, M. and Palma-Cando, 2020).

II.7 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri memerlukan pengetahuan terkait morfologi, biokimia, fisiologis, dan genetiknya. Ciri-ciri tersebut dapat menjadi fenotipik dan genotipik (Zourob *et al.*, 2008). Identifikasi bakteri yang dilakukan secara fenotipik memiliki kekurangan, yaitu metode tersebut memiliki keakuratan yang dinilai rendah,

membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang diperlukan sehingga metode alternatif secara genotipik. Identifikasi bakteri secara genotipik memanfaatkan metode deteksi molekuler yang dinilai memiliki keakuratan yang tinggi dengan penggunaan yang luas dan dapat dijadikan Arahan dalam mengetahui suatu potensi bakteri dari urutan gennya (Suardana, 2014). Secara prosedural, disarankan untuk dimulai dengan secara luas secara fenotipik (misalnya pengecatan Gram) dan dilanjutkan ke pengujian yang lebih spesifik secara genotipik yang mengarah pada kemungkinan genus dan spesies isolat (Zourob *et al.*, 2008).

II.7.1 Karakteristik Morfologi

Morfologi koloni bakteri meliputi bentuk koloni, dimensi, pigmentasi, dan lain-lain. Morfologi sel, seperti yang diamati di bawah mikroskop, termasuk reaksi Gram (positif atau negatif), bentuk (misalnya, coccus atau batang), pengorganisasian (misalnya, tunggal atau rantai), keberadaan dan sifat endospora (misalnya, sentral atau terminal), flagelasi (mis., kutub atau peritrichous), dan lainnya. Tidak seperti eukariota, bakteri memiliki sifat morfologi sederhana yang tidak dapat diandalkan sebagai alat untuk mengklasifikasikan organisme tersebut. Meskipun isolat bakteri tidak dapat diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologisnya, mengungkapkan ciri-ciri ini dapat memandu analisis dalam mengembangkan skema yang baik (Zourob *et al.*, 2008).

II.7.2 Sifat Biokimia dan Fisiologis

Sejumlah besar karakteristik dan sistem fisiologis telah digunakan dalam penelitian bakteri. Hasil tes ini dapat digunakan dalam bakteri berdasarkan taksonomi numerik. Identifikasi isolat bakteri mungkin memerlukan 100-200

pengujian dan algoritma yang tepat untuk menganalisis data ini dan memprediksi identitas isolat (Zourob *et al.*, 2008).

Sifat biokimia dan fisiologis dapat dilihat sebagai berikut (Zourob *et al.*, 2008):

- a. Reaksi biokimia yang cepat. Ini menunjukkan adanya enzim tunggal atau kompleks enzim. Reaksi yang dikatalisis oleh enzim permukaan atau ekstraseluler dapat dianalisis dengan mudah dan cepat. Reaksi lain mungkin memerlukan enzim inkubasi isolat dengan substrat selama beberapa jam. Mewakili kategori ini adalah reaksi yang dikatalisis oleh katalase, oksidase, nitrat reduktase, amilase, β -galaktosidase, termonuklease, dan urease.
- b. Fermentasi karbihidrat. Analisis yang dapat menguji kemampuan isolat dalam memanfaatkan karbihidrat tertentu sebagai satu-satunya sumber karbon. Profil karbihidrat dapat berguna dalam mengidentifikasi isolasi bakteri. Fermentasi glukosa, sorbitol, dan manitol adalah contoh pengujian dalam kategori ini.
- c. Gambaran fisiologis lain-lain. pertumbuhan pada suhu yang berbeda, nilai pH, konsentrasi garam, dan lingkungan gas adalah beberapa sifat yang digunakan dalam mengidentifikasi bakteri. Isolat juga dapat diuji untuk pertumbuhan dengan adanya berbagai zat antimikroba (misalnya, antibiotik).

II.7.3 Identifikasi Berbasis Molekuler Gen 16S rRNA

Identifikasi bakteri berdasarkan urutan nukleotida saat ini merupakan pendekatan yang paling dapat diandalkan. Polymerase Chain Reaction (PCR) memiliki aplikasi yang luas baik di laboratorium diagnostik dan penelitian yang secara rutin digunakan dalam diagnosis dan identifikasi bakteri. Identifikasi bakteri secara molekuler berbasis gen 16S rRNA digunakan secara lebih luas dan

merupakan alat (primer universal) yang berguna untuk mengidentifikasi bakteri yang sulit diidentifikasi dengan uji biokimia. Sekuens gen 16S rRNA telah digunakan secara ekstensif untuk mempelajari evolusi dan filogeni bakteri. Sejumlah besar informasi urutan gen 16S rRNA tersedia di *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) dan Ribosomal Database Project (RDP), sekuens gen 16S rRNA adalah alat penting dalam sistematika bakteri dan melihat spesies baru (Buller, 2004).

Gen 16S ribosomal RNA (16S rRNA) merupakan bagian yang dimiliki oleh prokariot yang bersifat terkonservasi sehingga tepat digunakan sebagai primer universal dalam *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing yang kemudian dianalisis untuk menentukan taksonomi dari bakteri tersebut. Selain itu, fungsi gen 16S rRNA dari waktu ke waktu tidak berubah sesuai jarak evolusinya sehingga keterkaitan evolusi antar spesies dapat diketahui, memiliki bagian *hyper variabel region* untuk memudahkan dalam identifikasi bakteri, bersifat ubikuitas dengan fungsi yang bersifat identik pada setiap mikroorganisme sehingga mampu membedakan berbagai spesies, dan gen 16S rRNA (1.500 bp) cukup besar untuk tujuan informatika (Suardana, 2014).

Analisis urutan gen penyandi 16S rRNA ini menjadi tulang punggung klasifikasi filogenetik bakteri. Primer universal untuk gen yang dilestarikan ini dapat digunakan untuk memperkuat urutan suatu gen dari organisme yang ingin diidentifikasi. Untuk mengidentifikasi suatu isolat, urutan nukleotida gen 16S rRNA dicocokkan dengan urutan yang diketahui dalam *database* genom yang tersedia secara luas (misalnya, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Strain yang memiliki kesamaan < 97% dalam urutan gen 16S rRNA mewakili spesies yang berbeda.

Lebih lanjut, galur spesies dengan $\geq 97\%$ dalam sekuens gen ini memungkinkan spesies yang sama; dalam hal ini, keterkaitan DNA harus dinilai sebelum membuat kemungkinan akhir (Zourob *et al.*, 2008).

II.8 Tahapan Metode Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

II.8.1 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari mikroorganisme, terutama bakteri, menjadi metode penting hampir semua penelitian mikrobiologi modern. Ekstraksi atau pemurnian DNA genom dari kultur bakteri sebagai dasar dilakukannya analisis molekuler, dan proses ini dapat dilakukan dengan menggunakan kit yang tersedia secara komersial (Wright *et al.*, 2017).

Beberapa reagen yang diperlukan dan digunakan dalam ekstraksi DNA, diantaranya (Wright *et al.*, 2017):

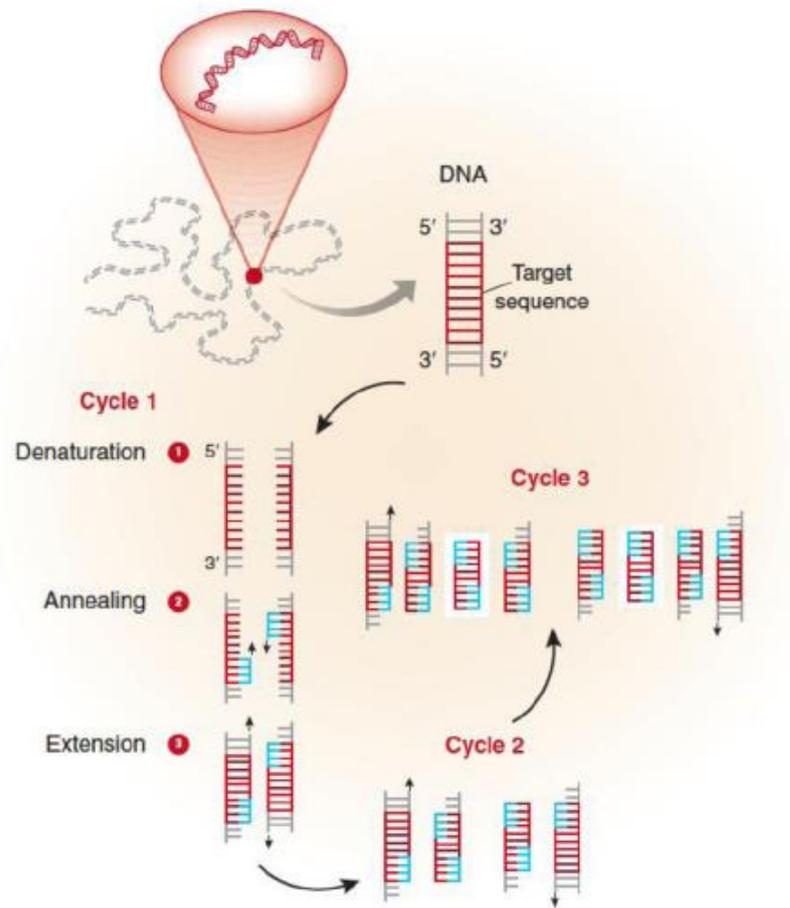
1. RNase, dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. RNase berperan dalam mendegradasi RNA untai tunggal dengan Buffer P1, buffer resuspensi yang terdiri dari 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA.
2. Achromopeptidase, dengan konsentrasi 50 kU/mL. Achromopeptidase merupakan enzim lisis dengan aktivitas bakteriolitik yang kuat terhadap dinding sel bakteri Gram-positif.
3. Lysozyme, dengan konsentrasi 24000 kU/mL. Lysozyme merupakan enzim lisis dengan aktivitas bakteriolitik yang kuat terhadap dinding sel bakteri Gram-negatif.
4. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), dengan konsentrasi 10%. SDS berperan dalam solubilisasi lipid pada membran sel.

5. Proteinase K, dengan konsentrasi 20 mg/mL. Proteinase K berperan dalam pencernaan protein.
6. Larutan Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (PCL), dengan rasio 25: 24: 1. PCL berperan dalam pemisahan DNA dari komponen seluler lainnya.
7. Etanol, dengan konsentrasi 100%. Etanol berperan dalam presipitasi DNA dari larutan.
8. Tris-EDTA (TE) Buffer, yang terdiri dari 10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA. Larutan buffer/penyangga yang digunakan untuk menyimpan DNA murni (purifikasi).

Efisiensi ekstraksi DNA dari filtrasi dan ekstraksi/pemurnian DNA penting jika kuantifikasi yang dibutuhkan benar. Efisiensi ekstraksi DNA dapat bervariasi tergantung pada matriks air, filter yang digunakan untuk ekstraksi, buffer lisis, kit ekstraksi yang digunakan dan jumlah sel (Sadowsky dan Whitman, 2011).

II.8.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode sintesis enzimatis secara *in vitro* dan amplifikasi fragmen DNA tertentu. Pada tahun 1985, American Karray dan ilmuwan lainnya memelopori teknologi PCR, dan dikembangkan oleh perusahaan Cetus Amerika Serikat. Dengan perkembangan dan terobosan ilmu pengetahuan dan teknologi, teknologi PCR banyak digunakan di berbagai bidang, seperti deteksi mikroba, kedokteran hewan, budidaya dan lain sebagainya. Teknik ini memiliki sensitivitas, akurasi dan spesifisitas yang kuat, serta dapat dideteksi dengan cepat, sehingga bidang aplikasinya terus meluas (Yu *et al.*, 2017).



Gambar 3. Skema Prinsip Kerja PCR (Garibyan & Avashia, 2013).

Teknologi PCR didasarkan pada urutan DNA yang diamplifikasi dengan DNA sintetis yang memiliki dua ujung rantai yang melengkapinya dua primer oligonukleotida. Secara *in vitro* deteksi urutan DNA (*template*) diamplifikasi dalam aksi enzimatik. Keseluruhan proses PCR berlangsung dengan beberapa siklus, satu siklus terdiri dari 3 langkah: langkah pertama adalah denaturasi template DNA secara terus-menerus dalam kondisi suhu yang tinggi, yaitu pada suhu 93-94 °C selama 5 menit dalam kondisi rantai terdenaturasi; langkah kedua adalah *annealing* 2 primer oligonukleotida sintetis dengan rantai DNA cetakan pada suhu 55 °C selama 1 menit; langkah ketiga perpanjangan/ekstensi pada suhu 72 °C selama 1

menit yang diikuti dengan elongasi akhir selama 5 menit, dengan 4 jenis substrat dNTP. Pada tahap perpanjangan, rantai primer sepanjang arah 5'-3' membentuk rantai baru secara komplementer dengan DNA *template* dengan menggunakan DNA Taq polimerase. Setelah siklus ini, rantai baru disintesis dan dapat dilanjutkan sebagai cetakan DNA yang bisa didaur ulang. Selama siklus, jumlah produk yang diamplifikasi meningkat secara eksponensial, dan siklus salinan gen tunggal bisa mencapai 25-30 kali (Suardana, 2014; Yu *et al.*, 2017). Langkah-langkah reaksi PCR sederhana, tetapi operasi spesifiknya rumit, seperti penentuan suhu penempelan, ekstensi, dan jumlah siklus.

Ada banyak keuntungan dari penggunaan PCR. Pertama, sebagai teknik yang sederhana untuk dipahami dan digunakan, dan menghasilkan hasil dengan cepat. Kedua, teknik ini sangat sensitif dengan potensi menghasilkan jutaan hingga miliaran salinan produk tertentu untuk pengurutan, kloning, dan analisis. Meskipun PCR memiliki kelebihan dan sangat penting akan hasil yang didapatkan dari penggunaannya, namun PCR memiliki keterbatasan. Karena PCR adalah teknik yang sangat sensitif, segala bentuk kontaminasi sampel dengan jumlah jejak DNA yang sama dapat menghasilkan hasil yang keliru. Selain itu, dalam mendesain primer untuk PCR diperlukan beberapa data sekuens sebelumnya. Oleh karena itu, PCR dapat digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya patogen atau gen yang diketahui. Batasan lain adalah bahwa primer yang digunakan untuk PCR dapat menempel secara tidak spesifik ke urutan yang serupa, tetapi tidak sepenuhnya identik dengan DNA target. Selain itu, nukleotida yang salah dapat dimasukkan ke dalam urutan PCR oleh DNA polimerase, meskipun dengan kecepatan yang sangat rendah (Garibyan dan Avashia, 2013).

II.8.3 Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis

Ada dua metode utama yang digunakan untuk memvisualisasikan produk PCR: (1) pengecatan produk DNA yang diperkuat dengan pewarna kimia seperti etidium bromida, yang menginterkalasi antara dua untai dupleks atau (2) memberi label pada primer PCR atau nukleotida dengan pewarna fluoresen (fluorofor) sebelum amplifikasi PCR. Metode terakhir mendukung label untuk langsung dimasukkan ke dalam produk PCR. Metode yang paling banyak digunakan untuk menganalisis produk PCR adalah penggunaan elektroforesis gel agarosa, yang memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatan. Elektroforesis gel agarose adalah metode termudah untuk memvisualisasikan dan menganalisis produk PCR. Ini memungkinkan untuk penentuan keberadaan dan ukuran produk PCR. Satu set produk DNA yang telah ditentukan sebelumnya dengan ukuran yang diketahui dijalankan secara bersamaan pada gel sebagai penanda molekuler standar untuk membantu menentukan ukuran produk (Garibyan dan Avashia, 2013).

II.8.4 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dimulai pada 1970-an ketika virus Lambda (50.000 nukleotida) diurutkan oleh Sanger dan koleganya. Pada waktu itu sekuensing DNA dilakukan untuk genom kecil seperti virus dan organel, dan sekuensing lengkap bakteri tidak dapat dilakukan karena keterbatasan ekonomi dan teknis. Namun, kemudian sekuensing genom manusia berhasil dilakukan, dan peningkatan teknologi sekuensing memfasilitasi sekuensing genom secara keseluruhan. Bakteri pertama yang diurutkan adalah *Haemophilus influenzae*, dan ini dilakukan dengan metode *shot gun* yang dikembangkan oleh Sanger dan koleganya. Secara singkat, metode sekuensing *shot gun* terdiri dari pengambilan sampel secara acak dan

menentukan 500-700 nukleotida yang dibaca dan kemudian menyusunnya untuk merekonstruksi urutan sampel. Karena proses perakitan didasarkan pada penemuan wilayah yang tumpang tindih, lebih dari 1 juta basa harus diurutkan untuk mengurutkan genom. Nilai rata-rata dari setiap basis yang diurutkan dalam proyek genom. Metode sekuensing yang dikembangkan oleh Sanger dianggap sebagai standar, dan selama bertahun-tahun, sekuensing genom total dari banyak bakteri telah dilakukan menggunakan metode ini (Donkor, 2013).

II.8.5 Analisis Sekuens DNA

Setelah genom bakteri diurutkan, hal berikutnya adalah membuat anotasi. Anotasi adalah suatu proses di mana informasi struktural, fungsional, dan informasi biologis lainnya disimpulkan dari gen atau protein, dan didasarkan pada kemiripan dengan urutan yang dikarakterisasi sebelumnya dalam data base publik dan memerlukan analisis bioinformatika. Alat bioinformatika seperti BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dapat diakses melalui (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) telah ditemukan sangat berguna. Langkah pertama dalam proses anotasi adalah urutan pengkodean protein yang diprediksikan, yang umumnya disebut kerangka baca terbuka. Tidak seperti genom eukariotik, identifikasi kerangka pembacaan terbuka pada genom bakteri dan prokariotik lainnya sangat akurat dan juga lebih mudah karena tidak adanya intron dan juga kepadatan gen yang tinggi yang dimiliki oleh organisme ini. Hanya sebagian dari semua kerangka pembacaan terbuka dalam urutan genom yang benar-benar mengkodekan protein, dan prediksi fungsinya dengan perbandingan basis data dengan gen serupa dari fungsi yang diketahui merupakan tahap selanjutnya dalam proses anotasi (Donkor, 2013).

Informasi tentang berbagai sekuens gen organisme termasuk strain yang telah diurutkan dan dijelaskan secara lengkap dilaporkan di situs web Sanger Institute atau *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) melalui alat BLAST. Setelah genom diurutkan dan beranotasi, telah diperoleh informasi dasar untuk memahami kondisi biologi suatu organisme, dan selanjutnya adalah memanfaatkan data genom (Donkor, 2013).

Kemiripan antar spesies bakteri yang didapatkan dinilai cukup tinggi apabila mencapai persentasi kemiripan $\geq 97\%$ dan dapat dikatakan satu spesies, sedangkan jika persentase kemiripan yang didapatkan spesies $< 97\%$ dinilai satu cakupan dalam tingkatan genus (Winand *et al.*, 2020). Skor yang lebih buruk karena kualitas urutan yang buruk dianggap sebagai hasil yang tidak dapat diinterpretasikan (Frickmann *et al.*, 2015).