

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karst merupakan ekosistem yang unik terutama pada karakteristik morfologi dan hidrologinya. Bentang alam karst meliputi kawasan dengan formasi batuan yang mudah larut, seperti batu kapur (CaCO_3) dan dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) (Shi et al., 2024). Karst sering kali memiliki bukit-bukit berbentuk kerucut, cekungan tertutup berbentuk bulat atau lonjong (dolina), dan lubang-lubang yang terhubung ke sungai bawah tanah. Di bawah permukaan karst pada umumnya terdapat gua-gua dengan stalaktit dan stalagmit. Di dalam gua yang terbentuk terkandung air yang menciptakan kelembapan yang tinggi sehingga ideal untuk kehidupan beberapa spesies hewan maupun mikroorganisme (Sumarga et al., 2024). Kawasan karst di Indonesia mencakup luas sekitar 15,4 juta hektar dan tersebar hampir di seluruh Indonesia (Gonzales et al., 2018). Salah satu wilayah karst terbesar di Indonesia adalah kawasan Karst Maros-Pangkep di Sulawesi Selatan (Ilmi et al., 2024). Provinsi Sulawesi memiliki fenomena eksokarst dan endokarst meliputi gugusan bukit-bukit batu gamping yang menempati bagian tengah daerah Maros menyebar ke utara hingga daerah Pangkep. Sebaran perbukitan batu gamping Maros-Pangkep menempati lahan sekitar 42.000 hektar. Posisi geografis kawasan ini terletak antara $119^\circ 34' 17''$ – $119^\circ 55' 13''$ Bujur Timur dan antara $4^\circ 42' 49''$ – $5^\circ 06' 42''$ Lintang Selatan (Nuhung, 2016).

Gua karst memiliki kondisi lingkungan yang relatif tertutup dan ekstrem, ditandai dengan kegelapan, kelembapan tinggi, suhu yang cukup stabil, dan kondisi oligotrofik. Namun pada kondisi ini, terdapat beragam mikroorganisme yang dapat bertahan hidup dengan ketersediaan nutrisi yang sangat terbatas (Zhu et al., 2021). Dalam lingkungan yang sangat khusus, sebagian besar mikroorganisme dapat memproduksi berbagai biomolekul untuk persaingan nutrisi (Tufekci et al., 2023). Mikroorganisme adalah komponen utama dalam pembentukan atmosfer, hidrosfer, dan memainkan peran penting dalam pembentukan gua karst serta siklus nutrisi organik dan anorganik. Contohnya bakteri penghasil hidrogen sulfida (H_2S) (Keeler and Lusk., 2021). Komunitas bakteri merupakan indikator biologis yang sangat sensitif terhadap perubahan lingkungan (Zhu et al., 2025). Berbagai faktor seperti lokasi geografis, sifat fisik dan kimia tanah, serta karakteristik iklim, menjadi faktor yang dapat mempengaruhi keberagaman suatu komunitas bakteri (Zheng et al., 2025). Pada skala global, iklim berfungsi sebagai penggerak utama perubahan dalam komunitas bakteri. Kondisi iklim, seperti perubahan suhu dan curah hujan, secara signifikan mempengaruhi komunitas bakteri. (Li et al., 2024). Suhu adalah faktor lingkungan yang krusial dengan mempengaruhi pertumbuhan, aktivitas, dan komposisi komunitas bakteri (Haq et al., 2025).

Berdasarkan suhu ekstremnya, bakteri dikategorikan sebagai psikrofil mesofil, termofilik dan hipertermofilik (Thakur et al., 2022). Sebagian besar bakteri menghasilkan enzim yang bersifat termofilik dan hipertermofilik (Valenzuela et al., 2024). Enzim merupakan senyawa yang dibuat oleh makhluk hidup, salah satunya bakteri yang berfungsi untuk mempercepat berbagai reaksi biologis dan biokimia, baik dengan melibatkan berbagai jenis polisakarida dan protein, atau dengan memecah bahan-bahan

kompleks seperti polimer dan lipid (Salah & Alwabsi, 2024). Enzim termostabil adalah enzim yang dapat menahan suhu tinggi, biasanya antara 45°C hingga 120°C. Enzim ini tidak hanya dapat bertahan pada suhu tinggi, tetapi juga berfungsi di lingkungan ekstrem di mana manusia tidak dapat bertahan (Hussian & Leong, 2023). Umumnya bakteri termofilik mampu tumbuh dan bertahan hidup pada suhu yang lebih tinggi. Bakteri termofilik menunjukkan potensi luar biasa untuk aplikasi bioteknologi karena kemampuannya menghasilkan enzim dan protein termostabil, termasuk amilase, selulase, kitinase, pektinase, xilanase, protease, lipase, dan DNA polimerase (Guta et al., 2024). Enzim amilase, protease, dan lipase adalah contoh utama enzim yang ditemukan pada sebagian besar bakteri termofilik (Alrumman et al., 2018).

Berbagai perubahan kondisi lingkungan, termasuk yang disebabkan oleh perubahan iklim, telah diamati dalam beberapa tahun terakhir (misalnya kenaikan suhu) dan diperkirakan akan terus meningkat hingga 2,5-3,5°C pada akhir abad ini. Meskipun banyak faktor yang memengaruhi struktur komunitas biologis, perubahan suhu menjadi fokus utama karena variabel ini mempengaruhi laju pertumbuhan, reproduksi, fenologi, dan dinamika trofik organisme. Dampak kenaikan suhu telah diamati pada makhluk hidup melalui perubahan pola komposisi dan kelimpahan (Machado et al., 2020). Dalam beberapa tahun terakhir, kemajuan teknologi sequencing kapasitas tinggi telah secara bertahap mengungkap komunitas bakteri yang ada di gua-gua menunjukkan tingkat keragaman taksonomi yang tinggi (Ma et al., 2021). Banyak penelitian telah mengonfirmasi dampak pemanasan terhadap struktur komunitas bakteri serta aktivitas enzim yang dihasilkan oleh bakteri. Pemanasan global berdampak pada struktur komunitas bakteri baik dalam jangka pendek maupun panjang (Che et al., 2022).

Perubahan suhu lingkungan adalah salah satu faktor abiotik penting yang memengaruhi struktur, fungsi, dan dinamika komunitas bakteri (Ji et al., 2024). Meskipun bakteri tanah masih menjadi salah satu mikroorganisme yang paling melimpah dan beragam serta memiliki peran ekologi yang sangat penting, respon bakteri terhadap suhu yang meningkat belum sepenuhnya dieksplorasi karena kelompok taksonomi yang kompleks dan beragam. Namun, berkat kemajuan teknologi *next-generation sequencing* (NGS), studi metagenomik kini lebih mudah diakses sehingga memungkinkan analisis lebih mendalam mengenai komunitas bakteri tanah (Mun & Ling). Metabarcoding 16S rRNA adalah aplikasi NGS yang paling banyak digunakan untuk meneliti komunitas mikroba (Spatola et al., 2025). Penggunaan teknik amplifikasi gen 16S rRNA yang dipadukan dengan sekuensing DNA yang canggih memungkinkan studi menyeluruh terhadap komunitas bakteri. Metode molekuler yang diterapkan dalam pengkajian keberagaman bakteri dari sampel lingkungan memberikan informasi yang lebih menyeluruh. Pemanfaatan urutan DNA yang diekstrak secara langsung dari sampel lingkungan tertentu terbukti menjadi salah satu cara paling efektif untuk menilai komposisi komunitas bakteri pada sampel tersebut (Celik & Keskin, 2022).

Berdasarkan hal di atas, diperlukan eksplorasi untuk mengetahui perubahan suhu lingkungan yang diproyeksikan terjadi pada akhir abad ke-21 akibat perubahan iklim global. Perubahan suhu menjadi salah satu faktor lingkungan utama yang diasumsikan berpengaruh terhadap keanekaragaman bakteri dan secara tidak langsung juga memengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan bakteri. Suhu berperan penting dalam mengatur laju metabolisme, pertumbuhan, dan kemampuan adaptasi bakteri terhadap

lingkungan. Perubahan suhu di luar batas optimum dapat menyebabkan pergeseran struktur komunitas bakteri, seleksi terhadap kelompok yang toleran atau adaptif, dan perubahan aktivitas enzimatis yang berperan penting dalam proses biogeokimia. Oleh sebab itu, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kenaikan suhu di masa depan terhadap keanekaragaman komunitas dan aktivitas enzim bakteri asal Kawasan Gua Karst Maros-Pangkep.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini yakni:

1. Mengetahui pengaruh kenaikan suhu terhadap jumlah bakteri dari kawasan gua Karst Maros–Pangkep dengan metode TPC.
2. Mengetahui aktivitas enzim ekstraseluler isolat bakteri dari kawasan Gua Karst Maros–Pangkep terhadap kenaikan suhu.
3. Menganalisis pengaruh kenaikan suhu terhadap keanekaragaman komunitas bakteri dari kawasan Gua Karst Maros–Pangkep dengan metode metabarcoding.

1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini yakni diharapkan dapat memberikan informasi terkait pengaruh kenaikan suhu di masa depan terhadap aktivitas enzim bakteri serta kelimpahan dan pergeseran keanekaragaman komunitas bakteri asal Kawasan Gua Karst Maros-Pangkep.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli-Desember 2025. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar Kawasan Gua Karst Maros-Pangkep. Isolasi, karakterisasi dan pengujian enzim dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium terpadu, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Ekstraksi dan Sequencing dilakukan di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Centre* (HUMRC) Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, bunsen, spoit, sendok tanduk, spatula, tabung sentrifus, rak tabung, micropipet, DynaMag™-2 Magnet (Invitrogen), MinION & GridION device, hula mixer, microfuge, Magnetic rack, Thermal cycler, qubit fluorometer, *cool box*, lemari pendingin, vortex, oven (Heraeus), timbangan analitik (Ohaus), sentrifuge (Hettich), Biological Safety Cabinet (BSC), inkubator, komputer.

2.3 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel tanah dari Kawasan Gua Karst Maros-Pangkep, medium Nutrient Agar (NA), medium Nutrient Broth (NB), agar bacteriological, tween-80, skim milk, starch, pepton, NaCl. $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, minyak zaitun, metyl red, eppendorf tube, blue tip, Lysis Solution, PCR inhibitor removal, DNase/RNase Free Water, 16S Barcoding Kit 24 V14, Qubit dsDNA HS Assay Kit, nuclease-free water, MinION & GridION Flow Cell.

2.4 Metode Kerja

2.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Leang Lompoa, Leang Mandauseng, Leang Parewe, dan Leang Saluka. Proses *sampling* dilakukan dengan mengambil sampel tanah di sekitar gua Karst secara aseptis. Sampel tanah diambil menggunakan sekop kecil yang telah disterilkan dengan alkohol, lalu dimasukkan ke dalam wadah yang steril dan disimpan di dalam *cooler box*.

2.4.2 Sterilisasi Alat dan bahan

Teknik sterilisasi untuk alat-alat gelas seperti cawan petri dan tabung reaksi yaitu dengan metode panas kering menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Kemudian untuk jarum ose disterilkan dengan metode panas kering menggunakan nyala api bunsen hingga panas membara. Adapun untuk medium pertumbuhan dan aquadest disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

2.4.3. Pembuatan Medium

Medium Nutrient Agar (NA). Sebanyak 7 gram medium NA ditimbang dan dilarutkan ke dalam 250 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

Medium Plate Count Agar (PCA). Sebanyak 4,7 gram medium PCA ditimbang dan dilarutkan ke dalam 200 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

Medium Skim Milk Agar (SMA). Sebanyak 2,5 gram medium skim milk, 2 gram Nutrient Broth (NB), dan 3,75 gram agar ditimbang dan dilarutkan ke dalam 250 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

Medium Starch Agar (SA). Sebanyak 1,25 gram medium starch, 2 gram nutrient broth (NB), dan 3,75 gram agar ditimbang dan dilarutkan ke dalam 250 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

Medium Tween-80 Agar. Sebanyak 2,5 gram pepton, 1,25 gram NaCl, 0,025 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan 5 gram agar ditimbang dan dilarutkan ke dalam 250 mL *aquadest* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Selanjutnya ditambahkan 0,025 gram metil red, 6 mL Tween-80, dan 12 mL minyak zaitun steril lalu dihomogenkan hingga larut.

2.4.4 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan teknik pengenceran bertingkat hingga 10^{-9} . Pengenceran bertingkat diawali dengan menimbang sampel tanah sebanyak 5 gram lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 45 mL *aquadest* steril dan dihomogenkan, pada tahapan ini merupakan pengenceran 10^{-1} . Kemudian, hasil tiga tingkat pengenceran terakhir diinokulasikan pada medium Plate Count Agar (PCA) dengan metode tuang (*pour plate*) dan selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 30°C (d disesuaikan dengan suhu rata-rata gua) lalu diamati pertumbuhan koloni yang terbentuk. Koloni yang tumbuh kemudian dilakukan perhitungan total koloni bakteri menggunakan *Standart Plate Count* (SPC) dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{TPC} = \text{Jumlah Koloni Bakteri} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

2.4.5 Karakterisasi Bakteri

Pengamatan Morfologi Koloni. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium NA dengan metode gores kuadran, kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang terbentuk kemudian diamati bentuk, tepian, elevasi, dan warnanya menggunakan mikroskop stereo.

Pengamatan Morfologi Sel. Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan gram. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diulas pada kaca preparat, kemudian ditetesi aquadest dan difiksasi. Setelah difiksasi, ulasan ditetesi 2-3 tetes larutan *crystal violet* dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan *aquadest*. Selanjutnya ulasan ditetesi 2-3 tetes larutan JKJ dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan aquadest. Kemudian, ulasan ditetesi 2-3 tetes larutan alkohol-aseton lalu dibilas menggunakan aquadest. Ulasan selanjutnya ditetesi 2-3 tetes larutan safranin dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan aquadest. Kemudian ulasan ditetesi minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

2.4.6 Uji Aktivitas Enzim Ekstraseluler Bakteri

Uji Aktivitas Enzim Lipase. Sebanyak 1 ose isolat bakteri hasil pemurnian ditumbuhkan pada media Tween-80 Agar dengan metode inokulasi titik (*spot inoculation*) kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif koloni bakteri yang ditandai dengan zona bening kemudian ditumbuhkan pada media yang sama lalu diinkubasi pada suhu 30°C, 40°C, dan 50°C. Koloni yang tumbuh kemudian diamati lalu diukur diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Lipolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (mm)}}{\text{Diameter Koloni (mm)}}$$

Uji Aktivitas Enzim Protease. Sebanyak 1 ose isolat bakteri hasil pemurnian ditumbuhkan pada media Starch Agar (SA) dengan metode inokulasi titik (*spot inoculation*) kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif koloni bakteri yang ditandai dengan zona bening kemudian ditumbuhkan pada media yang sama lalu diinkubasi pada suhu 30°C, 40°C, dan 50°C. Koloni yang tumbuh kemudian diamati lalu diukur diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Proteolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (mm)}}{\text{Diameter Koloni (mm)}}$$

Uji Aktivitas Enzim Amilase. Sebanyak 1 ose bakteri hasil pemurnian ditumbuhkan pada media Skim Milk Agar (SMA) dengan metode inokulasi titik (*spot inoculation*) kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Hasil positif koloni bakteri yang ditandai dengan zona bening setelah penambahan larutan iodin, kemudian ditumbuhkan pada media yang sama lalu diinkubasi pada suhu 30°C, 40°C, dan 50°C. Koloni yang tumbuh kemudian ditetaskan kembali dengan larutan iodin dan diamati serta diukur diameter zona bening dan diameter koloni yang terbentuk dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Amilolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening (mm)}}{\text{Diameter Koloni (mm)}}$$

2.4.7 Identifikasi Keanekaragaman Bakteri dengan Analisis Metabarcoding

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti protokol ekstraksi DNA yang tertera pada ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research). Sebanyak 0,25 gram tanah digunakan sebagai input. Proses bead beating dilakukan selama 3 menit dengan jeda pendinginan selama 30 detik di atas es untuk mencegah denaturasi DNA. Proses lisis dilakukan sebanyak dua kali dan hasilnya digabung dalam kolom Zymo Spin™ IICR agar efisiensi ekstraksi meningkat. DNA yang diperoleh dimurnikan hingga volume akhir 50 µL, kemudian diukur konsentrasinya menggunakan Qubit Fluorometer. Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 18,9 ng/µL, dinyatakan layak digunakan untuk proses amplifikasi gen 16S rRNA.

Amplifikasi DNA. Prosedur ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diekstraksi dengan mengikuti protokol yang tertera pada Rapid Barcoding Protocol V14. Volume total reaksi terdiri atas 6 µL DNA template, 5,5 µL air bebas nuklease, 12,5 µL master mix, 0,5 µL primer forward 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 0,5 µL primer reverse 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Proses amplifikasi dilakukan dalam 25 siklus, yang mencakup *initial denaturation* pada suhu 95°C selama 1 menit, *denaturation* pada suhu 95°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik, *extension* pada suhu 65°C selama 2 menit, dan *final extension* pada suhu 65°C selama 5 menit. Produk PCR kemudian diverifikasi menggunakan gel agarosa 1% dengan penambahan Smobio Nucleic Acid Gel Stain (0,01%v/v). Elektroforesis dijalankan pada 100V selama 30 menit dan menghasilkan pita DNA berukuran 1500 bp yang menandakan amplifikasi berhasil. Kuantifikasi ulang hasil PCR dilakukan dengan Qubit Fluorometer menunjukkan konsentrasi DNA amplicon sebesar 68,8 ng/µL dan memenuhi syarat untuk proses sekuensing.

Pembuatan Library, Sekuensing, dan Analisis Bioinformatika. Proses pembuatan library dan sekuensing dilakukan menggunakan platform Oxford Nanopore PromethION dengan pendekatan amplicon sequencing berbasis gen 16S rRNA. Library disiapkan mengikuti protokol Native Barcoding Kit SQK-NBD114.24 (Oxford Nanopore Technologies) dengan beberapa penyesuaian. Sebanyak 190 ng DNA dalam 12,5 µL air bebas nuklease digunakan sebagai input. Tahap endprep diinkubasi pada suhu 20°C selama 30 menit dan 65°C selama 5 menit. Ligasi barcode dilakukan menggunakan native 96-barcode kit, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit, kemudian dicuci dengan etanol 80% sebelum tahap sekuensing.

Sekuensing dijalankan satu kali dengan sistem Dorado Basecall Server v7.9.8 menggunakan model dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup@v5.0.0, dengan minimum Q-score 10 serta pemangkasan adaptor dan barcode otomatis. Evaluasi kualitas hasil dilakukan menggunakan NanoPlot untuk menilai panjang bacaan, nilai Q, dan distribusi kualitas data. Analisis taksonomi dan keanekaragaman mikroba dilakukan menggunakan EPI2ME workflow (wf-16S v1.4.0) dengan basis data ncbi_16s_18s_28s_ITS. Basis data tersebut mencakup berbagai penanda gen mikroba, namun dalam penelitian ini hanya sekuens gen16S rRNA yang dianalisis.

2.4.8 Analisis Data.

Uji aktivitas enzim bakteri disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Data hasil metabarcoding dianalisis dengan perangkat lunak Nanopore MinKNOW dan disajikan dalam tabel kelimpahan taksonomi dan indeks keanekaragaman Shannon dan Simpson.