

BIOGROUTING: PRODUKSI UREASE DARI BAKTERI LAUT (*Oceanobacillus* sp.) PENGENDAP KARBONAT

Nama Mahasiswa : Sidratu Ainiah
NRP : 1510 100 010
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT

Abstrak

*Biogrouting adalah teknologi yang mensimulasikan proses diagenesis yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir (calcarinite/sandstone). Permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana mengoptimasi produk urease dengan melakukan uji aktifitas, mengisolasi, mempurifikasi dan mengkarakterisasi urease serta mengaplikasikannya sebagai material grout. Uji aktifitas dan optimasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Oceanobacillus* sp. pada 2 variasi medium (B4 urea dan B4 urin), 5 variasi pH (4-8) dan 2 variasi suhu (25°C dan 29°C). Hasil uji aktifitas dan optimasi selanjutnya dipurifikasi menggunakan ammonium sulfat (Uji Bradford) dan dicari titik isoelektriknya. Kemudian hasil protein presipitat dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa aktifitas urease paling tinggi adalah 70.21 unit/ml. Urease optimal dihasilkan pada isolat yang ditumbuhkan pada B4 urea pada pH 7 temperatur 25°C. Berat molekul urease yang dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE adalah 440 kDa, sedangkan titik isoelektriknya pada pH 6. Urease dapat dijadikan material grout karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi pada aplikasi sederhana biogrouting.*

*Kata kunci: Biogrouting, diagenesis, *Oceanobacillus* sp., urease*

**BIOGROUTING: UREASE PRODUCTION FROM
CARBONAT PRESIPITATION BACTERIA**
(*Oceanobacillus* sp.)

Nama Mahasiswa : Sidratu Ainiyah
NRP : 1510 100 010
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo,
MT

Abstract

Grouting is the process of pore filling with grout material (construction material). Biogrouting is a technology that simulates the process of diagenesis, namely the transformation of grains of sand into sandstone (calcarinite / sandstone). Calcite (CaCO_3) formed from biogrouting process would bind sand grains causing the cementation process. The research problem is how to optimize the product with the urease activity test, isolate, purify and characterize urease and applying it as a grout material. Testing and optimization activities carried out by growing isolates *Oceanobacillus* sp. 2 variations on the medium (urea and B4 B4 urine), 5 variations of pH (4-8) and 2 variations of temperature (25°C and 29°C). Test results and optimization activities further purified using ammonium sulfate (Test Bradford) and sought isoelectric point. Then the results of the protein precipitates were characterized using SDS-PAGE. Based on the survey results revealed that the highest urease activity was 70.21 units / ml (generated from isolates of urease on urea medium B4). Optimal urease produced in isolates grown in medium B4 urine pH 8 and a temperature of 25°C , while in medium B4 urea at pH 7 a temperature of 25°C . The molecular weight of urease were characterized using SDS-PAGE was 440 kDa, whereas the isoelectric point at pH 6. Urease can be used as grouting material because it has the ability to do a simple application biogrouting cementation.

Keyword: Biogrouting, diagenesis, *Oceanobacillus* sp., urease

LEMBAR PENGESAHAN

BIOGROUTING: PRODUKSI UREASE DARI BAKTERI LAUT PENGENDAP KARBONAT

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

SIDRATU AINIYAH
NRP. 1510 100 010

Disetujui Oleh Pembimbing Tugas Akhir

Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, MT.....(Pembimbing 1)

Surabaya, 8 Agustus 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi

Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907199803 2 001

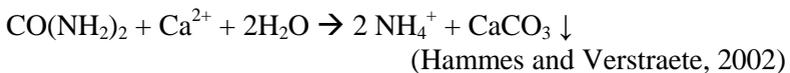


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Biogrouting*

Biogrouting merupakan teknologi yang mensimulasikan proses diagenesis, yaitu transformasi butiran pasir menjadi batuan pasir. Secara alami, proses ini memerlukan waktu hingga jutaan tahun. *Biogrouting* sering disebut sebagai biosementasi karena prosesnya dapat menghasilkan semen (Lisdiyanti, 2011).

Saat ini Australia telah mengembangkan *Calcit In-situ Precipitation System* (CIPS) untuk merestorasi atau memperkuat permukaan monumen sebagai aplikasi *biogrouting*. Di Belanda, Perusahaan *Smart Soil* dan *Delft University* juga aktif mengembangkan teknologi ini (Ismail *et al.*, 2002). *Biogrouting* digunakan untuk memperkuat struktur tanah di kawasan pesisir dalam upaya pencegahan erosi pantai, dan reklamasi (Van Paasen, 2008). Mekanisme pembentukan semen pada proses *biogrouting* secara sederhana memanfaatkan proses presipitasi karbonat oleh bakteri. Pada mekanisme ini bakteri menghidrolisa urea dengan dikatalis oleh urease. Dengan adanya Ca^{2+} terlarut disekitarnya, maka akan dihasilkan kristal padat kalsit (CaCO_3) yang akan berikatan, seperti reaksi dibawah ini:



2.2 Bakteri *Biogrouting*

Menurut Drew (1910) terdapat sekelompok bakteri yang berkontribusi terhadap pembentukan kalsit. Pembentukan kalsit ditentukan oleh 3 parameter yaitu konsentrasi kalsium, konsentrasi karbonat, dan pH lingkungan (Hammes and Verstraete, 2002; Hammes *et al.*, 2003a and b). Kalsit (CaCO_3) dihasilkan dari presipitasi karbonat yang dapat ditemukan di bebatuan seperti batu marmer dan batu pasir, di perairan maupun di daratan (Hammes and Verstraete, 2002).

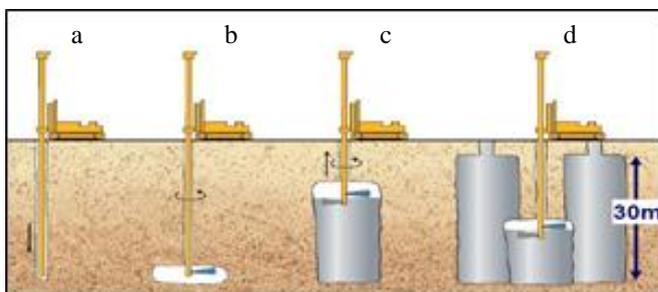
Bakteri *biogrouting* toleran terhadap konsentrasi urea dan kalsium yang tinggi. Bakteri ini menghasilkan urease dengan aktivitas tinggi. Bakteri penghasil urease dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok berdasarkan responnya terhadap amonium yaitu (1) aktivitas ureasenya dipengaruhi oleh keberadaan amonium (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes autrophus*, *Bacillus megaterium* (Kaltwasser *et al.*, 1972), *Klebsiella aerogenes* (Friedrich and Magasanik, 1977)) dan (2) aktivitas ureasenya tidak dipengaruhi oleh amonium (*Sporosarcina pasteurii* (*Bacillus pasteurii*), *Proteus vulgaris*, *Helicobacter pylori*). Beberapa tahun terakhir bakteri dari genus *Sporosarcina* (*Bacillus*) telah mulai diaplikasikan pada proses *biogrouting* karena mempunyai aktivitas urease yang tinggi dan tidak patogen (Fujita *et al.*, 2000; Mobley *et al.*, 1995).

2.3 Aplikasi *Biogrouting*

Pertumbuhan populasi dunia membutuhkan lahan yang sesuai untuk pembangunan infrastruktur pendukung. Hal tersebut dibatasi oleh ketersediaan tanah dengan kondisi yang baik. Saat ini, lebih dari separuh populasi dunia bermukim di kawasan bertanah rapuh (*weak soil*), seperti di delta, pesisir atau tepian sungai. Kondisi tanah tersebut memiliki lapisan air tanah yang dangkal, tersusun oleh gambut, lempung atau pasir, sehingga mengakibatkan, erosi, abrasi pantai, dan tanah longsor (Van Paasen, 2008).

Pendekatan umum untuk menanggulangi tanah rapuh adalah dengan menginjeksikan bahan sintetik, misalnya semen, epoksi, akrilamid, fenoplast, silikat dan poliuretan (Xanthakos *et al.*, 1994; Karol, 2003) ke dalam pori-pori tanah untuk mengikat partikel tanah. Pada gambar 2.1 proses injeksi dapat dilakukan dengan teknik *grouting* secara kimia yaitu *jet grouting* (Karol, 2003). Lapisan tanah yang mengalami perubahan dengan penggunaan teknik *grouting* dibatasi oleh kapasitas peralatan *mixing* yang relatif sederhana, sehingga tidak cocok digunakan untuk pelaksanaan *grouting* dalam volume yang besar. Selain itu,

pada teknik *grouting* dibutuhkan biaya besar (sebagai contoh, *jet grouting* menghabiskan biaya 400 Euro tiap 1 m³ tanah). Aplikasi teknik ini harus menggunakan alat berat (Gambar 2.1 a) yang menginjeksikan *grout* pada struktur tanah yang akan diperbaiki (Gambar 2.1 b). Selanjutnya *grout* dengan tanah dire suspensikan untuk mempercepat proses diagenesis (Gambar 2.1 c dan d). Metode ini mengakibatkan infrastruktur di sekitar lokasi *grouting* terganggu. Teknik *grouting* ini secara signifikan mengurangi permeabilitas tanah yang mengalami perlakuan, sehingga menghambat aliran air tanah dan membatasi injeksi (Gambar 2.1d) (Van Paassen, 2008).



Gambar 2.1 Teknik *Jet Grouting* (Zwieten, 2008)

Teknik *grouting* hanya efektif sekitar 1 – 2 m dari titik injeksi, sehingga kontrol kualitas hanya dapat dilakukan dengan mengawasi volume zat yang diinjeksikan dan tekanan yang. Pengukuran *real time* yang dapat memantau perubahan yang terjadi di bawah permukaan tanah tidak dapat dilakukan. Kondisi ini mendorong terjadinya perbedaan pada desain awal yang mengakibatkan penambahan biaya (De Jong *et al*, 2009).

Tabel 2.1 Kajian Kekuatan Struktur Tanah Dari Hasil *Biogrouting*

No.	Mikroorganisme	Objek	Hasil	Referensi
1.	<i>Bacillus pasteurii</i>	Remediasi rekahan beton	Kekuatan regangan, peningkatan kekuatan kompresi	Bang, Galinat and Ramakrishnan, (2001)
2.	<i>Bacillus pasteurii</i> ATCC 11859 dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Remediasi rekahan beton	Peningkatan (Compressive Strength) dan Kekakuan semen	Ramachandran, Ramakrishnan, and Bang (2001)
3.	<i>Sporosarcina pasteurii</i> (DSMZ 33)	Perbaikan kondisi tanah	Peningkatan kekuatan, kekakuan tanah, perbaikan kapasitas pada tanah	Whiffin <i>et al.</i> (2007)
4.	<i>Bacillus pasteurii</i>		Peningkatan kekakuan tanah	De Jong (2006)
5.	<i>Sporosarcina pasteurii</i> (DSMZ 33)	Perbandingan kandungan CaCO_3 dengan kekuatan beton	Peningkatan <i>unconfined compressive strength</i> sejalan dengan peningkatan kandungan CaCO_3	Harkes <i>et al.</i> (2008)

Alternatif lain dari *biogrouting* adalah menginjeksikan bakteri penghasil urease, bersama dengan nutriennya (urea dan CaCl_2) dengan komposisi dan tahapan tertentu. Bakteri penghasil urease ini akan mengkatalisis urea sehingga melepas ion

karbonat, yang selanjutnya akan terikat dengan ion kalsium dari CaCl_2 dan mempresipitasikan kalsit (CaCO_3). Kalsit inilah yang mengikat partikel tanah satu sama lain sehingga tanah berpasir mengalami transformasi menjadi batuan pasir (Van Paasen, 2008).

Biogrouting dapat bekerja pada pori-pori yang berukuran nano meter (*nano technology*). Kelebihan tersebut dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki kondisi tanah guna meningkatkan kekuatan (*strength*) dan kekakuan (*stiffness*), serta sedikit mempengaruhi permeabilitas, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.1. Kajian ini bertujuan untuk memberikan gambaran tentang aplikasi teknologi *biogrouting* menggunakan mikroorganisme.

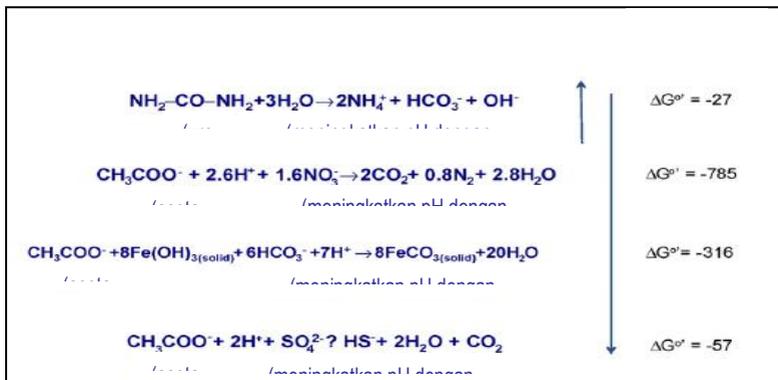
2.4 Dasar Metode *Biogrouting*

Secara alami *biogrouting* membutuhkan waktu hingga jutaan tahun. Sebagai contoh presipitasi kalsium karbonat dari aliran air tanah, peningkatan evapotranspirasi dari tanah atau pembentukan kalsium karbonat. Hal ini terjadi karena alkalinitas karbonat meningkat akibat dari pembusukan bahan organik dari mikrobia membutuhkan waktu yang cukup lama (Gambar 2.2) (Mozley and Davis, 2005).



Gambar 2.2 *Stromatolit* hasil presipitasi kalsium karbonat yang diinduksi oleh mikrobia.

Proses diagenesis pada *biogrouting* adalah akibat presipitasi kalsit oleh bakteri penghasil urease. Presipitasi kalsit ini menjadi penting karena mampu mengubah butiran pasir menjadi batuan pasir (*calcarenit/sandstone*). Berdasarkan Gambar 2.3 terdapat beberapa metode yang digunakan untuk mempresipitaskan kalsit dengan mediasi mikroorganisme. Secara alami *biogrouting* dapat meningkatkan pH dan membentuk kondisi sangat jenuh yang penting untuk presipitasi kalsit. Perubahan energi bebas pada kondisi standar ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 1\text{ atm}$, $[C] = 1\text{ M}$) ketika proses hidrolisis urea lebih rendah dibandingkan dengan proses lain. Hal ini disebabkan karena reaksi tersebut mengubah kondisi lingkungan dari suatu sistem (misalnya dengan peningkatan pH), yang menghambat proses kompetitif lain (Pikuta *et al.* 2007). Selain itu, proses presipitasi kalsit dengan hidrolisis urea lebih banyak digunakan dibandingkan metode alternatif lain karena lebih cepat membentuk kondisi lingkungan yang sangat jenuh (De Jong *et al.* 2009).



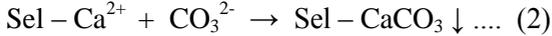
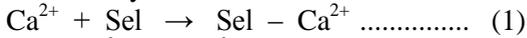
Gambar 2.3 Metode-metode Presipitasi Kalsit dengan Mediasi Mikroorganisme (De Jong *et al.*, 2009)

Presipitasi kalsit merupakan fungsi dari konsentrasi sel, kekuatan ionik dan pH media (Lappin-Scott 1998 and Deo 1997). Menurut Ramakrishnan *et al* (2000) terdapat teori mengenai proses presipitasi kalsit oleh bakteri, yaitu:

Teori I

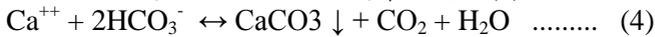
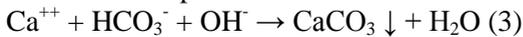
Mikroorganisme (seluruh permukaan selnya bermuatan negatif) menarik kation termasuk ion Ca^{2+} dari lingkungan dan terdepositkan pada permukaan sel.

Formula berikut menjelaskan reaksi sel bakteri dengan senyawa di sekitarnya:



Teori II

Menurut teori ini, kalsit dipresipitasikan dan dibentuk melalui beberapa reaksi di bawah ini:



Formula (3) dipicu oleh adanya perubahan pH. Lingkungan pH yang tinggi disebabkan oleh aktivitas bakteri(Formula 5). Oleh karena itu, bakteri berperan sebagai katalis pada presipitasi kalsit.



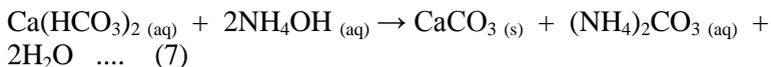
Teori III

Pada air laut, presipitasi kalsit disebabkan oleh reaksi amonium karbonat (suatu produk hasil dekomposisi bahan organik ber-nitrogen), dengan kalsium sulfat yang memang telah terkandung dalam air laut (Ramakrishnan *et al*, 2000).

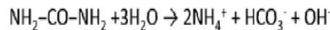
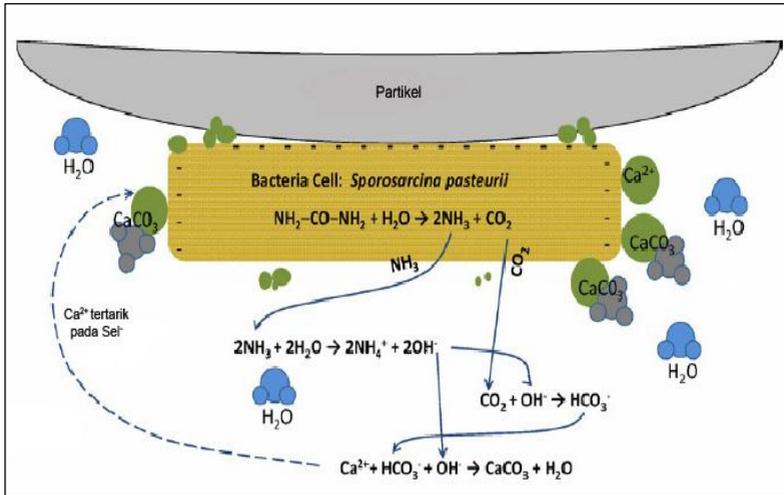


Teori IV

Kalsium karbonat kemungkinan bereaksi dengan amonia yang diproduksi oleh bakteri dan menyebabkan presipitasi kalsium karbonat melalui reaksi berikut:



Pada Gambar 2.4 menunjukkan aktivitas metabolik *Sporosarcina pasteurii*, salah satu jenis bakteri tanah yang bersifat alkalifilik. Bakteri ini memiliki urease yang sangat aktif (Ferris *et al*, 1996). Molekul kimia akan berdifusi menembus dinding sel bakteri mendekomposisinya menjadi ammonia (NH_3) dan karbon dioksida (CO_2). Selanjutnya, bakteri mengambil urea sebagai induktor untuk menghasilkan urease dan reaksi yang spontan akan terjadi dengan adanya air. Amonia akan dikonversi menjadi ammonium (NH_4^+) dan karbondioksida akan menyeimbangkan reaksi kimia menjadi asam karbonat, ion karbonat dan ion bikarbonat, sesuai dengan pH lingkungannya. Kenaikan pH disebabkan karena ion hidroksil (OH^-) yang terbentuk dari produksi NH_4^+ yang melebihi ketersediaan Ca^{2+} untuk presipitasi kalsit. Hal ini menyebabkan lingkungan alkalin, sehingga karbonat dibutuhkan untuk presipitasi kalsit (CaCO_3). Sel bakteri yang bermuatan negatif akan tertarik menuju permukaan partikel tanah karena konsentrasi nutrien yang lebih tinggi di permukaan sel (Hall-Stoodley *et al*, 2004), selain juga karena karakteristik fisikokimia dari sel bakteri maupun partikel tanah itu sendiri (Falk and Wuerts, 2007).



Gambar 2.4. Reaksi Presipitasi kalsium karbonat dengan mediasi bakteri (De Jong *et al*, 2009).

2.5 Bakteri yang Berperan dalam *Biogrouting*

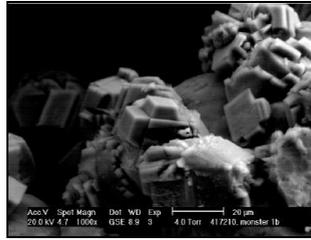
Presipitasi Kalsium Karbonat (CaCO_3) oleh bakteri merupakan fenomena alam yang biasa terjadi di berbagai lingkungan geologis, dari mata air panas sampai ke lingkungan laut dan gua (Boquet *et al*, 1973). Bakteri pembentuk karbonat tersebut misalnya *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus pasteurii* atau *Sporosarcina pasteurii*, *Deleya halophila*, *Halomonas eurihalina*, dan *Myxococcus xanthus* (Rivadeneira *et al*, 1991; 1996; 1998; Tiano *et al*, 1999; Castanier *et al*, 2000; Bang *et al*, 2001; Rodrigues-Navarro *et al*, 2003; Whiffin *et al*, 2007).

Menurut Zwieten (2008) salah satu contoh bakteri yang mampu mempresipitasi kalsium karbonat adalah *Sporosarcina*

pateurii. Bakteri tersebut berperan dalam presipitasi kalsit di lingkungan dengan memproduksi urease. Urease merupakan enzim yang mengandung nikel, mengkatalisis urea untuk memproduksi CO_2 dan amonia sehingga menyebabkan peningkatan pH di sekelilingnya dimana ion mineral (Ca^{2+} dan CO_3^{2-}) dipresipitasi sebagai CaCO_3 (Van Paasen, 2008).

Metabolisme bakteri heterotrof mempengaruhi terjadinya proses presipitasi CaCO_3 secara pasif (Krumbein, 1972) maupun aktif (Cañaveras *et al.*, 2001). Pada presipitasi pasif, jalur metabolik seperti amonifikasi asam amino, reduksi nitrat, hidrolisis urea dan reduksi sulfat akan meningkatkan pH lingkungan di sekelilingnya dan memproduksi ion karbonat dan bikarbonat. Pada presipitasi aktif, karbonat diproduksi dengan pertukaran ion melalui membran sel (Castanier *et al.*, 2000). Proses kimia yang terjadi dapat dipengaruhi oleh empat faktor utama, yaitu: (a) Konsentrasi kalsium (Ca^{2+}), (b) Konsentrasi karbon anorganik terlarut, (c) pH dan (d) ketersediaan situs nukleasi (Baskar *et al.*, 2006; Kile *et al.*, 2000; Sanchez-Moral *et al.*, 1999).

Berbagai jenis bakteri mampu mempresipitasikan kristal karbonat polimorfik (kalsit, aragonit, dolomit, dan lain-lain) dengan jumlah, ukuran dan tipe yang berbeda, tergantung pada jenis bakteri dan pertumbuhannya (Chakraborty *et al.*, 1994). Berdasarkan hasil Scanning Electron Micrograph (SEM) Gambar 2.5 merupakan kalsit dengan struktur kristal berbentuk heksagonal dan rombohedral, serta bersifat stabil secara termodinamika.



Gambar 2.5 Hasil *Scanning Electron Micrograph (SEM)* proses mineralisasi. (Zwieten, G. 2008)

2.6 Urease

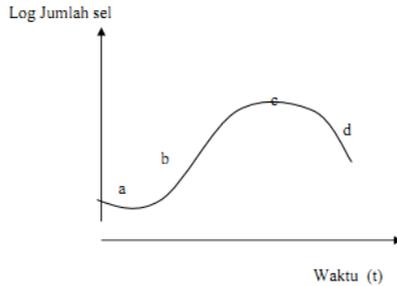
Urease terlibat dalam metabolisme urin. Urease mengkatalisis proses hidrolisis urea untuk menghasilkan amonia dan karbondioksida. Substrat urease adalah hydroxyurea. Jack Bean Urease adalah ilmuwan yang menemukan urease pertama kali dalam bentuk kristal, terdiri dari 91 kDa subunit dalam tiga bentuk protein. Massa molekul urease yang utama adalah 440-480 kDa dan dua bentuk yang lebih kecil memiliki rentang massa molekul 230-260 kDa dan 660-740 kDa. Memiliki titik isoelektrik poin pada pH 5-6. Optimum pada temperatur 60°C dan terdenaturasi pada temperatur 45°C selama 15 menit. Satu unit urease berarti 1 μ mol NH₃ yang dilepaskan pada pH 7 temperatur 25°C (*assay standart*) (Sigma and Aldrich, 2000).

2.7 Pertumbuhan Bakteri *Biogrou*t

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pertumbuhan sel bakteri *biogrou*t mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan. Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan dari nilai aritmatik.

Kurva pertumbuhan bakteri terdiri dari empat fase utama : fase lag , fase pertumbuhan eksponensial (fase

pertumbuhan cepat atau *log phase*), fase *stationer* (fase statis) dan fase penurunan populasi (*decline*). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Brock and Madigan, 1991).



Gambar 2.6 Kurva Pertumbuhan Bakteri, Keterangan: fase pertumbuhan: a= fase lag; b=fase eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi (Brock and Madigan,1991).

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

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

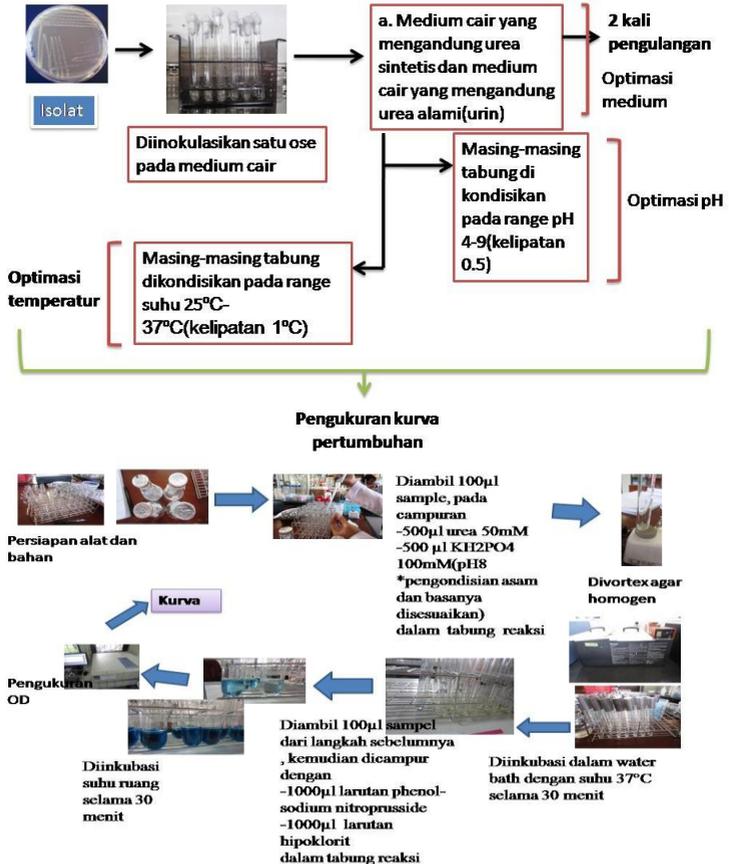
3.2 Metode yang Digunakan

3.2.1 Optimasi dan Uji Aktifitas Urease

Isolat *Oceanobacillus* sp. ditumbuhkan dalam medium produksi (*marine agar*) dan medium yang mengandung urin. Urin yang digunakan adalah urin wanita tidak hamil, usia 22 tahun, dan memiliki pH 5. Diinkubasi pada inkubator bergoyang (*rotary shaker*) 150 rpm pada suhu ruang (30°C) selama 72 jam. Aktivitas urease diukur menggunakan metode *Weatherburn* (1967) yang dimodifikasi (Gambar 3.1), yaitu Na₂HPO₄ digunakan dalam larutan alkalin hipoklorit dibandingkan dengan NaOH dan waktu pembentukan warna ditambah dari 20 menit menjadi 30 menit.

Reaksi dilakukan dalam tabung reaksi yang berisi 100 µl sampel, 500 µl urea 50 mM dan 500 µl buffer KH₂PO₄ 100 mM (pH 8,0) sehingga total volume adalah 1,1 ml. Campuran reaksi diinkubasi dalam *water bath* dengan suhu 37°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µl campuran reaksi ke dalam tabung yang berisi 1000 µl larutan phenol-sodium nitroprusside. Larutan alkalin hipoklorit sebanyak 1000 µl ditambahkan ke dalam tabung dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm dan dibandingkan dengan kurva standar (NH₄)₂SO₄. Satu unit enzim berarti jumlah enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1

$\mu\text{mol NH}_3$ dari urea per menit dalam kondisi standar (Van Warngaaden *et al*, 2010).



Gambar 3.1 Optimasi dan Uji Aktivitas Urease Menggunakan Kurva Standart

3.2.2 Isolasi dan Purifikasi Urease

Metode Presipitasi Protein Menggunakan Amonium Sulfat

Protein ekstrak kasar yang dihasilkan dari proses sentrifugasi dipresipitasi dengan ammonium sulfat hingga

mencapai konsentrasi ammonium sulfat 100%. Setelah proses presipitasi didapatkan endapan protein yang kemudian diresuspensikan menggunakan buffer salin fosfat hingga didapat protein presipitat sebanyak 10 ml. Protein presipitat yang dihasilkan kemudian ditentukan konsentrasinya menggunakan metode Bradford (Jumiarti, 2012).

Metode Isoelektrik Point

Titik Isoelektrik merupakan daerah tertentu dimana protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan negatif sama, sehingga tidak bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Pada pH isoelektrik (pI), daya kelarutan protein minimal, sehingga menyebabkan protein mengendap.

Pertama disiapkan 9 tabung reaksi bersih dan kering, lalu dimasukkan 1 ml urease pada tiap-tiap tabung. Pada setiap tabung ditambahkan 1 ml larutan buffer asetat masing-masing dari pH 4; 5 dan 6. Kemudian dikocok, lalu dicatat derajat kekeruhannya setelah 0, 10, dan 30 menit. Diamati berapa tabung yang terbentuk endapan maksimal. Selanjutnya semua tabung dipanaskan diatas penangas air. Diamati hasilnya. Pembentukan endapan kekeruhan paling cepat atau paling banyak merupakan titik isoelektrik (Burgess and Thomson, 2002).

3.2.3 Karakterisasi Urease

Elektroforesis SDS-PAGE

Karakterisasi protein menggunakan SDS-Page bertujuan untuk mengetahui berat molekulnya (BM). Protein yang telah diberi perlakuan dengan detergen yang mengandung ion kuat seperti *sodium dodesyl sulphate* (SDS) dan agen pereduksi akan mengalami eliminasi struktur (Weaver, 2005). Metode yang digunakan dalam pembuatan gel adalah metode Edelman and Bollag (1991). Bahan untuk separating gel dicampur satu persatu dengan memasukkan TEMED (Tetramethylethylenediamine) pada akhir campuran. Larutan tersebut diaduk dan dipipet perlahan ke dalam plate kaca sampai 1.5 cm dari permukaan kaca lalu didiamkan sekitar 15-20 menit. Dalam proses ini diusahakan agar tidak terbentuk gelembung udara. Setelah gel memadat,

campuran *stacking gel* dipipet perlahan ke dalam plate kaca lalu dengan segera dimasukkan sisir (10 sumur) sebagai tempat memasukkan sampel.

Sampel yang telah dipanaskan pada 100°C selama 3 menit dicampurkan dengan buffer sampel lalu dilakukan *loading* sampel ke dalam sumur sebanyak 12 μl . Berbeda halnya dengan sampel, Marker yang di-*loading* ke dalam sumur sebanyak 10 μl . Sebelum *running* dilakukan, buffer elektroforesis dimasukkan ke dalam chamber. *Running* elektroforesis dilakukan pada 120 Volt, 28 A dalam kondisi dingin. Waktu yang diperlukan untuk *running* elektroforesis sekitar 1.5 jam.

Setelah pemisahan, gel dilepas dari plate kaca lalu direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol + 12% asam asetat) selama 1 jam. Selanjutnya, gel tersebut direndam dalam larutan etanol 50% selama 20 menit dan larutan etanol 30% selama 2 x 20 menit. Setelah itu, gel tersebut direndam dalam larutan *enhancer* (larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) selama 1 menit. Gel kemudian dicuci dengan akuabides selama 3 x 20 menit. Setelah dicuci dengan akuabides, gel direndam dalam larutan *staining* silver nitrat (larutan AgNO_3 + formaldehida 37%) selama 30 menit lalu dibilas cepat dengan akuabides selama 2 x 20 detik. Kelebihan warna dihilangkan dengan larutan *destaining* (larutan Na_2CO_3 + formaldehida 37%) sampai diperoleh pita-pita protein yang jelas teramati dengan latar belakang relatif jernih. Reaksi dihentikan dengan menggunakan larutan fiksasi (Edelstein and Bollag, 1991).

3.2.4 Produksi Urease

Bakteri yang digunakan untuk aplikasi *biogrouting* adalah bakteri yang memiliki aktivitas enzim tertinggi diantara isolat yang lain. Isolat ditumbuhkan dalam media B4 cair 100 mL dan media urin 100 mL. Kemudian diinkubasi menggunakan Erlenmeyer 250 mL selama 5 hari diatur suhu, pH dan medium optimal (sesuai data optimasi urease).

Produk yang dihasilkan masih mengandung biomassa sel yang tidak dibutuhkan pada proses *biogrouting*. Urease dapat

diaplikasikan setelah hasil fermentasi disentrifugasi dengan kecepatan 10000-12000 rpm selama 15 menit (Lisdiyanti, 2011).

3.2.5 Aplikasi Urease pada *Biogrouting*

Aplikasi *biogrouting* dilakukan dengan menyiapkan urease pada *syringe* ukuran 5mL. Kemudian disiapkan pasir laut yang masih dalam kondisi salin(*fresh*) ke cetakan, kemudian ditimbang massa pasirnya. Pasir diberikan perlakuan menggunakan metode injeksi langsung (De Jong *et al*, 2006), dengan volume urease masing-masing 10 mL. Selanjutnya campuran pasir dan urease diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam, setiap 4 jam diukur perubahan pH pasir, pembentukan mineral kalsit secara visual dan proses pematannya. Secara kuantitatif diukur massa pasir setelah memadat (Harkes *et al*, 2009).

3.3 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *General Linear Model (GLM)*. Tiap perlakuan diulang 10 kali, tiap ulangan dibuat 3 kali pengukuran. Kombinasi yang digunakan adalah variasi jenis medium (sumber B4 urea dan B4 urin), pH (4; 5; 6; 7; 8, dan 9), dan temperatur (25⁰C dan 29⁰C) saat pengukuran aktivitas urease. Grafik yang menunjukkan nilai tertinggi dipilih sebagai kondisi paling optimum.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV

Hasil dan Pembahasan

4.1 Uji Aktifitas dan Optimasi Urease

Uji aktifitas dan optimasi dilakukan untuk mengetahui aktifitas optimum bakteri *biogrouting* dalam menghasilkan urease. Enzim inilah yang nantinya akan diproduksi untuk diaplikasikan pada skala laboratorium.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat dengan kode P3BG43. Berdasarkan penelitian sebelumnya isolat ini merupakan koleksi dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong. Menurut Lisdiyanti (2010), isolat P3BG43 ini diambil dari daerah dengan ketinggian (± 4.000 m di atas permukaan laut) yang memiliki tekanan udara rendah sehingga suhu lingkungan juga rendah. Oleh karena itu bakteri ini sulit ditumbuhkan di daerah tropis. Bakteri ini cukup sensitif terhadap perubahan lingkungan, suhu dan medium. Hal ini ditunjukkan dengan banyaknya pengulangan yang dilakukan untuk mengadaptasikan agar isolat dapat tumbuh. Perlu 4-5 kali kultivasi menggunakan medium NB, B4 (*marine agar*), dan NA.

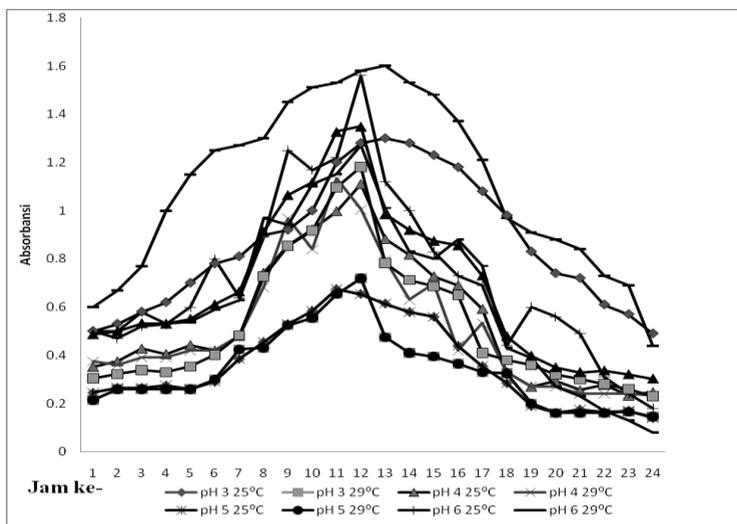
Berdasarkan penelitian sebelumnya isolat P3BG43 diidentifikasi sebagai *Oceanobacillus* sp, dengan karakteristik fenotipik antara lain berbentuk batang-lurus (berukuran $0.3-2.2 \times 1.2-7.0 \mu\text{m}$), bersifat motil dengan flagella tipe lateral, membentuk endospora resisten panas (dengan jumlah tidak lebih dari satu dalam satu sel sporangia) serta memberikan reaksi positif pada *urease test*. *Oceanobacillus* sp. tidak memiliki aktifitas enzim ekstraseluler ketika uji hidrolisis pati, *trybutirin* dan kasein. Isolat P3BG43 dipilih karena diketahui memiliki aktifitas urease paling tinggi berdasarkan metode Weatherburn (1967) yang dimodifikasi (Gambar 3.1).

Optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam medium B4 dan B4 yang termodifikasi menggunakan urin (B4 urin). Kemudian diukur kepadatan selnya menggunakan spektrofotometer. Medium B4

merupakan medium yang kandungan nutrisinya berisi mineral dan urea. Urea ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) mengandung ammonium yang menyebabkan presipitasi kalsit (Ramakrishnan *et al*, 2000). Sedangkan medium B4 yang sumber ureanya diganti dengan urin (B4 urin) mengandung ammonia (NH_3) (Lee, 2003). Kandungan amonia pada urin menyebabkan reaksi tidak sempurna untuk mempresipitasi karbonat. Keberadaan amonia dalam medium yang mengandung air (aquades) menyebabkan terjadinya reaksi spontan. Reaksi spontan yang terjadi akibat adanya air (H_2O) mengkonversi amonia (NH_3) menjadi ammonium (NH_4^+) dan karbondioksida (CO_2) akan menyeimbangkan reaksi kimia menjadi asam karbonat, ion bikarbonat dan ion karbonat. Kenaikan pH disebabkan karena ion hidroksil yang terbentuk dari produksi NH_4^+ yang melebihi ketersediaan Ca^{2+} . Kondisi ini menyebabkan lingkungan alkalin sehingga karbonat dibutuhkan untuk presipitasi kalsit.

Optimasi pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengondisikan pada 2 jenis medium, variasi pH kisaran 3-9 serta pada temperatur 25°C dan 29°C . Pengaturan kondisi medium, pH dan temperatur ini dilakukan dengan asumsi masih sesuai pada saat produk *biogrout* diaplikasikan di lingkungan.

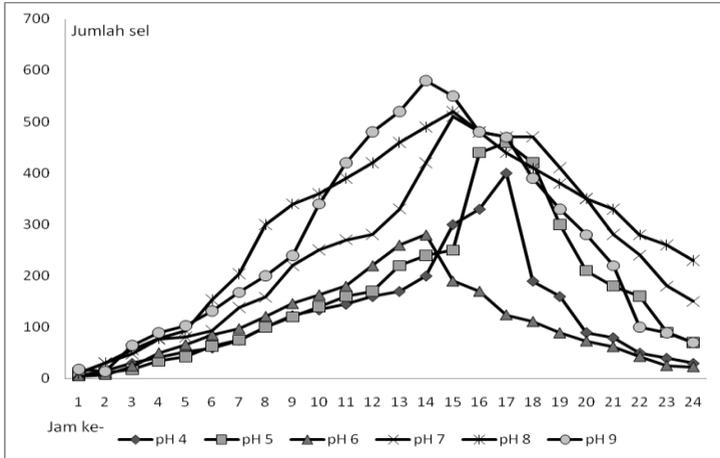
Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model* diketahui bahwa pada temperatur 25°C dan pH 7 merupakan kondisi optimum pertumbuhan bakteri *biogrouting* (Gambar 4.1). Diketahui *P value* kurang dari 0.05 ($p < 0.05$) (tolak H_0 terima H_1) yang berarti pH dan temperatur berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *biogrout*.



Gambar 4.1 Kurva Pertumbuhan Bakteri pada pH 3-8 dan temperatur 25°C dan 29°C pada Medium B4 Urea.

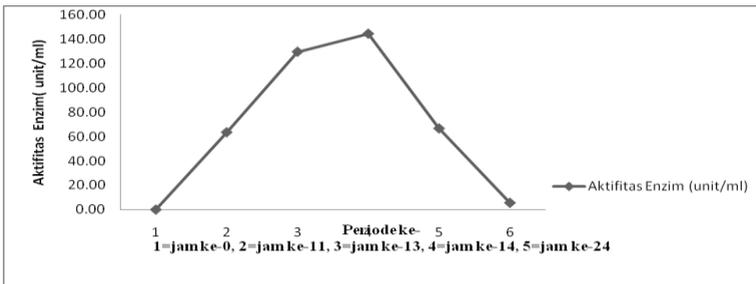
Sedangkan uji optimasi pertumbuhan bakteri *biogrouit* pada medium urin menunjukkan hasil yang kurang signifikan. Perlakuan dilakukan hingga 10x pengulangan. Hal tersebut dimungkinkan karena beberapa faktor diantaranya kisaran pH urin dan kadar amonia yang tidak terukur. Menurut Shafiee *et al* (2003) urin lebih banyak mengandung garam sisa metabolisme tubuh dan sedikit ammonia. Berdasarkan uji, diketahui bakteri *biogrouit* dapat tumbuh optimal pada medium B4 urin pH 8 dan temperatur 25°C.

Berdasarkan analisis data menggunakan *General Linear Model*, pertumbuhan bakteri pada B4 urin (Gambar 4.2) menunjukkan *p value* lebih kecil dari 0.05 ($p < 0.05$, $\bar{\alpha}$ (alfa) 5%). Angka tersebut menunjukkan bahwa urin yang terdapat dalam medium B4 signifikan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri (terima H_0 tolak H_1).



Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri pada Medium B4 Urin

Aktifitas urease diukur berdasarkan kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil analisis data, diketahui waktu optimal pertumbuhan bakteri adalah pada jam ke- 12 sampai jam ke- 13. Waktu tersebut diasumsikan sebagai waktu potensial untuk menghasilkan urease paling banyak. Berdasarkan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode Bradford diketahui 144 unit/ml (Gambar 4.3). Sedangkan pengukuran aktifitas enzim menggunakan metode Weatherburn (1967) didapatkan aktifitas urease 203.32 unit/ml.



Gambar 4.3 Aktifitas Urease pada Kondisi Optimum

4.2 Isolasi dan Purifikasi Urease

4.2.1 Presipitasi Protein Menggunakan Amonium Sulfat

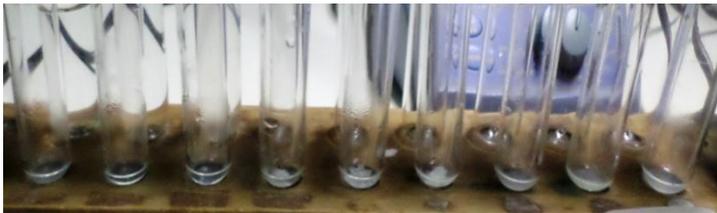
Presipitasi protein dilakukan untuk memisahkan *crude extract* yang mengandung urease dari senyawa-senyawa pengotor lain. Metode presipitasi protein menggunakan ammonium sulfat dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Protein yang dipresipitasi adalah enzim ekstrak kasar. Menurut Fujimoto *et al* (2002) protein yang akan dipresipitasi harus melalui tahap sentrifugasi karena densitas larutan jenuh bernilai rendah.

Berdasarkan hasil presipitasi ammonium sulfat, protein dapat terfraksinasi dalam larutan uji. Urease tidak menunjukkan pengendapan pada konsentrasi ammonium sulfat 40%. Presipitasi urease yang cukup signifikan terjadi pada konsentrasi ammonium antara 40% sampai 90% (Gambar 4.5). Pada konsentrasi ammonium sulfat 90% terjadi pengendapan yang paling besar, namun untuk pemisahan enzim ini lebih baik digunakan konsentrasi mulai 40%-80%. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Semakin tinggi konsentrasi garam maka kelarutan protein akan menurun (Englard and Seifter, 1990). Setelah didapatkan protein presipitat selanjutnya diuji menggunakan uji *Bradford*. Pengukuran konsentrasi protein menggunakan *Bradford* dilakukan berdasarkan nilai absorbansi maksimum. Reagen yang digunakan adalah *Coomassie Brilliant Blue G-250* yang terikat pada protein. Kemudian larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595nm.

Pengukuran aktifitas urease dari hasil presipitasi menggunakan ammonium sulfat. Aktifitas urease paling tinggi mencapai 70.21 unit/ml dan terendah 5.36 unit/ml. Aktifitas urease dalam satuan unit/ml berarti 1 unit enzim dibutuhkan untuk membebaskan 1 μmol NH_3 dari urea per menit dalam kondisi standar (Keikha *et al*, 2012).

4.2.2 Isoelektrik Point

Titik Isoelektrik merupakan kondisi tertentu dimana protein tidak mempunyai selisih muatan atau jumlah muatan positif dan negatif sama, sehingga tidak bergerak bila diletakkan dalam medan listrik. Titik isoelektrik pada enzim ekstrak kasar medium B4 urea dan B4 urin adalah pada pH 6 (Gambar 4.4). Hal ini ditunjukkan dengan terbentuk endapan paling banyak setelah dipanaskan.



(a)



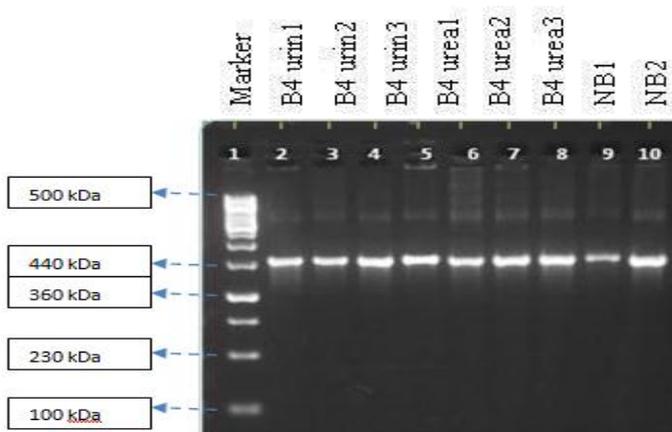
(b)

Gambar 4.4(a) *Isoelectric point* medium B4 urea (b) *Isoelectric point* medium B4 urin.

4.2.3 Karakterisasi Urease Elektroforesis SDS-PAGE

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

Berdasarkan pita protein yang terlihat pada gel poliakrilamid dengan *separating gel* 7%, *stacking gel* 3%, tegangan listrik 120 volt 28 A dan elektroforegram pewarnaan gel dengan *coomasie blue* diperoleh sembilan pita protein dengan berat molekul 440-500 kDa (Gambar 4.5). Pita paling identik berada pada berat molekul 440 kDa. *Acrylamide* 7% pada *separating gel* digunakan untuk memisahkan protein dengan berat molekul 100-500 kDa protein. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jones and Mobley (1989) bahwa berat molekul urease adalah 440-480 kDa.



Gambar 4.5 SDS-PAGE

4.3 Produksi Urease

Enzim yang akan digunakan untuk aplikasi *biogrouting* adalah enzim yang memiliki aktivitas tertinggi pada fase optimasi. Berdasarkan hasil analisis, aktifitas urease paling tinggi dihasilkan oleh bakteri yang ditumbuhkan pada medium B4 urea sebesar 70.21 unit/ml, sedangkan isolat yang ditumbuhkan pada B4 urin sebesar 51.74 unit/ml. Peneliti melakukan produksi dengan menumbuhkan isolat pada 2 variasi medium B4 masing-

masing 100ml medium. Berdasarkan rancangan penelitian isolat ditumbuhkan dalam medium B4 cair 1500 mL dan medium urin 1500 mL. Kemudian diinkubasi menggunakan fermentor(ukuran 5L) selama 5 hari diatur suhu, pH dan medium optimal (sesuai data optimasi urease). Fermentor yang digunakan merupakan fermentor modifikasi dari Renge *et al* (2012). Hal tersebut tidak dapat dilakukan karena terjadi kerusakan alat pada fermentor dan keterbatasan jumlah medium. Produksi dengan skala 100ml dikondisikan sesuai dengan pertumbuhan optimum bakteri (Gambar 4.6 a dan b). Medium B4 urea, bakteri optimal tumbuh pada pH 7 temperatur 25°C sedangkan medium B4 urin optimal tumbuh pada pH 8 suhu yang sama.



(a) (b)

Gambar 4.6 Produksi urease

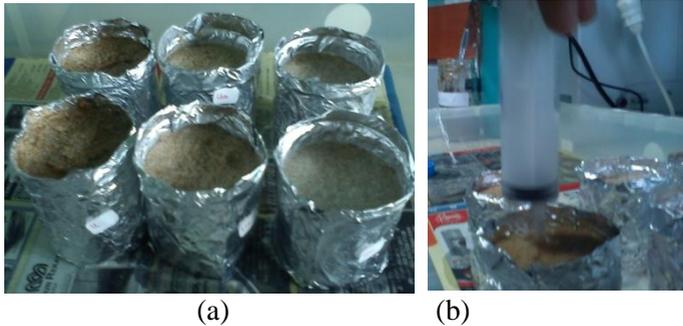
4.4 Aplikasi Urease pada *Biogrouting*

Aplikasi *biogrouting* dilakukan dengan metode injeksi langsung (De Jong *et al*, 2006) (Gambar 4.7 a). Sebanyak 10ml urease diinjeksikan pada 200gr pasir laut dengan kondisi salin (Gambar 4.87b). Berdasarkan pengamatan parameter aplikasi, pH pasir meningkat dari pH netral (7) menjadi pH basa (11). Terjadi pembentukan mineral kalsit secara visual, dan proses pemadatan pasir. Kontrol negatif yang digunakan adalah pasir tanpa diinjeksi urease.

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 4.1), terjadi peningkatan pH pasir serta permukaan pasir setelah perlakuan injeksi urease mulai rata dan mengeras. Mengerasnya pasir ini

disebabkan oleh adanya senyawa karbonat hasil aktifitas bakteri yang menjadi jembatan sementasi antara butiran pasir.

Terjadi perbedaan hasil antara *control* (tidak diinjeksi urease), dengan pasir yang diinjeksi dengan urease dari medium B4 urea dan B4 urin. Diduga kecepatan sementasi tersebut disebabkan oleh besar kecilnya aktifitas urease yang dihasilkan.



Gambar 4.7 Aplikasi *biogrouting*

Tabel 4.1 Kontrol Parameter Aplikasi *Biogrouting*

Pembentukan Mineral Kalsit		Time B4 Urea	Pembentukan Mineral Kalsit		Time B4 Urine	Pembentukan Mineral Kalsit		Time Kontrol
pH	Temperatur(°C)	I	pH	Temperatur(°C)	I	pH	Temperatur(°C)	I
	25			25			25	
7	+		7	-		7	-	
8	+		8	-		8	-	
9	+	9	+	9	-			
Massa(gr)		Time B4 Urea	Massa(gr)		Time B4 Urine	Massa(gr)		Time Kontrol
pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)	
	25			25			25	
7	150		7	150		7	0	
8	150	8	150	8	0			
9	150	9	150	9	0			
*Proses sementasi berlangsung sempurna			*Proses sementasi berlangsung kurang sempurna			Tidak terjadi sementasi		

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada medium B4 urea dengan pH 7 dan temperatur 25°C, sedangkan pada medium B4 urin bakteri *biogrout* tumbuh optimum pada temperatur 25°C dan pH 8. Pengukuran aktifitas urease mencapai 144.12 unit/ml. Berdasarkan karakterisasi protein menggunakan ammonium sulfat protein mengendap maksimal pada konsentrasi 90% (70.21 unit/ml). Diketahui titik isoelektrik urease adalah pada pH 6 dan memiliki berat molekul 440-500 kDa. Urease dapat dijadikan material *grout* karena memiliki kemampuan untuk melakukan sementasi (diagenesis) pada aplikasi sederhana *biogrouting* menggunakan pasir laut dengan kondisi salin.

5.2 Saran

Pengembangan penelitian *biogrouting* di Indonesia masih sangat kurang. Sedangkan *biogrouting* memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan menjadi material konstruksi yang lebih ramah lingkungan dari pada *water silica*. Sudah banyak penelitian mengenai eksplorasi *biogrouting*, namun aplikasi dan efisiensi urease belum banyak diteliti. Sehingga butuh lebih banyak penelitian mengenai teknik aplikasi *biogrouting*.

“ Halaman ini sengaja dikosongkan”

Lampiran 1: Analisis data

a. Analisis data Optimasi Bakteri pada Medium B4 Urea dan B4 Urin

General Linear Model: absorb versus medium; PH_g; jam

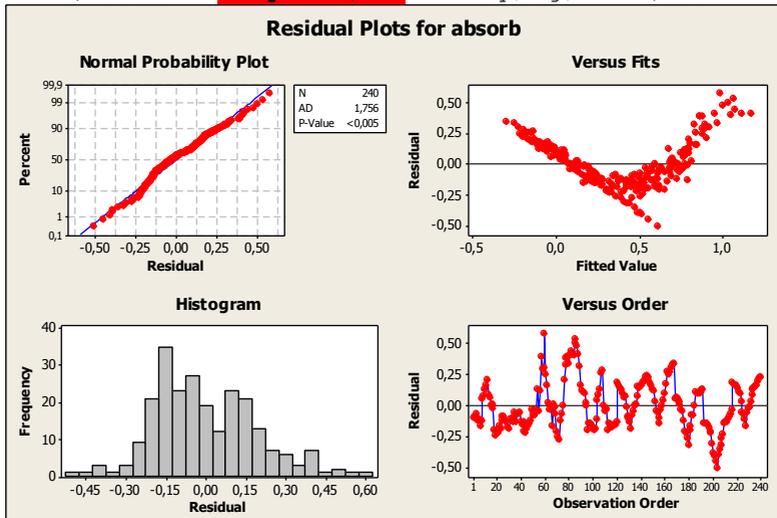
```

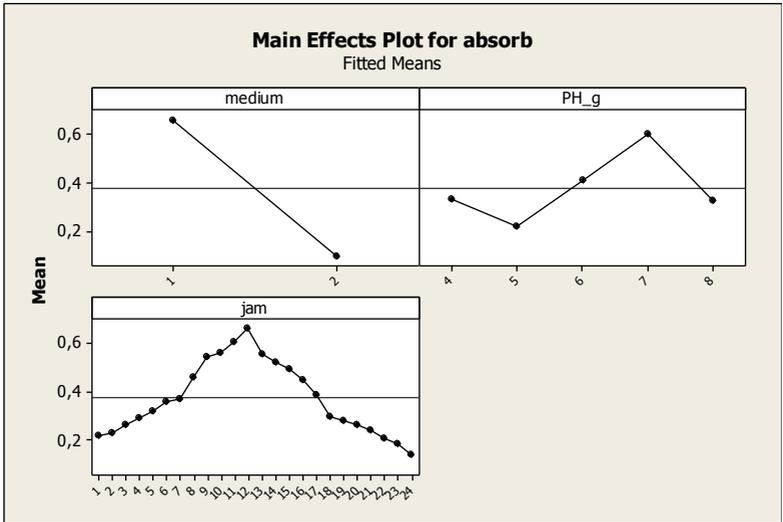
Factor   Type   Levels  Values
medium   fixed    2       1; 2
PH_g     fixed    5       4; 5; 6; 7; 8
jam      fixed   24      1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11;
12; 13; 14; 15; 16;
17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24
    
```

Analysis of Variance for absorb, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
medium	1	18,94809	18,94809	18,94809	447,86	0,000
PH_g	4	3,89188	3,89188	0,97297	23,00	0,000
jam	23	5,13405	5,13405	0,22322	5,28	0,000
Error	211	8,92695	8,92695	0,04231		
Total	239	36,90097				

S = 0,205689 **R-Sq = 75,81%** R-Sq(adj) = 72,60%





b. Analisis data Optimasi Bakteri pada Medium B4 Urin

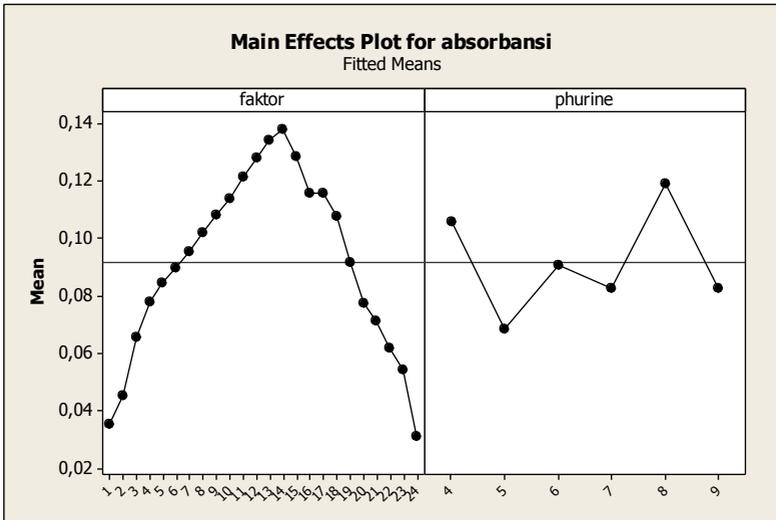
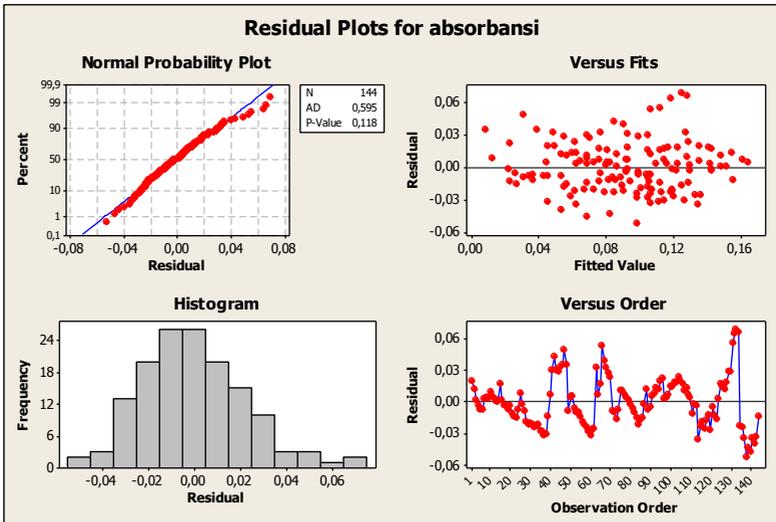
General Linear Model: absorbansi versus faktor; phurine

```
Factor   Type   Levels  Values
faktor   fixed   24      1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11;
12; 13; 14; 15; 16;
17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24
phurine  fixed    6      4; 5; 6; 7; 8; 9
```

Analysis of Variance for absorbansi, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
faktor	23	0,1356999	0,1356999	0,0059000	9,05	0,000
phurine	5	0,0393582	0,0393582	0,0078716	12,08	0,000
Error	115	0,0749548	0,0749548	0,0006518		
Total	143	0,2500129				

S = 0,0255300 **R-Sq = 70,02%** R-Sq(adj) = 62,72%



c. Optimasi pertumbuhan Bakteri pada Medium B4 Urea

General Linear Model: abs versus jamke; suhu; ph

Factor	Type	Levels	Values
jamke	fixed	24	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24
suhu	fixed	2	1; 2
ph	fixed	6	3; 4; 5; 6; 7; 8

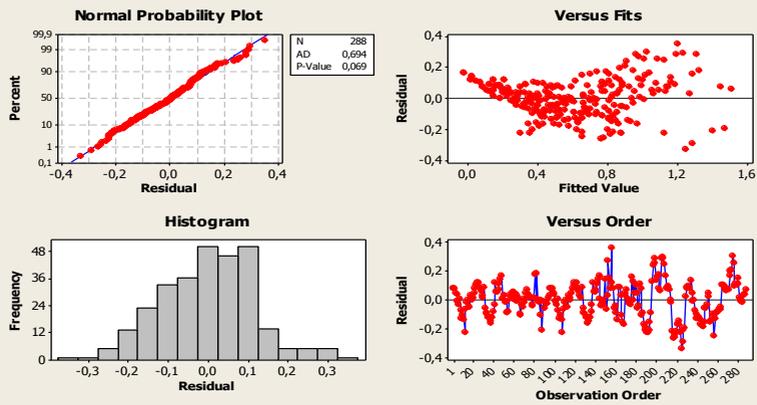
Analysis of Variance for abs, using Adjusted SS for Tests

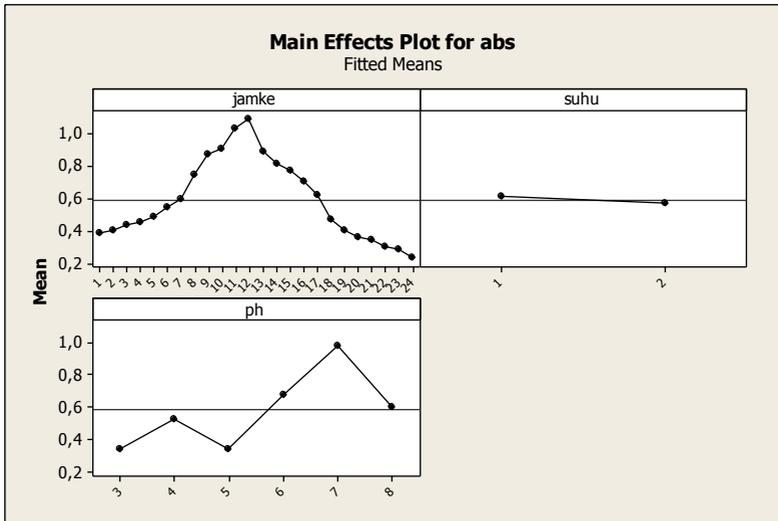
Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jamke	23	17,2535	17,2535	0,7502	49,04	0,000
suhu	1	0,1253	0,1253	0,1253	8,19	0,005
ph	5	13,7353	13,7353	2,7471	179,60	0,000
Error	258	3,9462	3,9462	0,0153		
Total	287	35,0603				

S = 0,123675

R-Sq = 88,74%

R-Sq(adj) = 87,48%

Residual Plots for abs



Lampiran 2: Data Optimasi Pertumbuhan Bakteridan Uji Bradford

a. Optimasi pertumbuhan bakteri *biogrout* pada medium B4 urea

Faktor		Absorbansi/Kepadatan Sel pada Jam ke-																							
pH	Temperatur(°C)	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00	13.00	14.00	15.00	16.00	17.00	18.00	19.00	20.00	21.00	22.00	23.00	24.00
4	25	0.25	0.27	0.27	0.28	0.26	0.29	0.39	0.46	0.53	0.59	0.68	0.66	0.62	0.58	0.56	0.44	0.36	0.29	0.19	0.16	0.18	0.17	0.17	0.14
	29	0.22	0.26	0.26	0.26	0.26	0.30	0.43	0.43	0.53	0.56	0.66	0.72	0.48	0.41	0.40	0.37	0.33	0.33	0.20	0.16	0.16	0.16	0.17	0.15
5	25	0.35	0.38	0.43	0.41	0.44	0.42	0.48	0.74	0.86	0.92	1.00	1.11	0.88	0.82	0.73	0.69	0.59	0.33	0.27	0.29	0.26	0.28	0.23	0.25
	29	0.38	0.36	0.39	0.39	0.42	0.42	0.48	0.68	0.97	0.84	1.13	1.01	0.80	0.63	0.70	0.42	0.53	0.33	0.27	0.27	0.24	0.24	0.24	0.23
6	25	0.50	0.47	0.52	0.53	0.60	0.80	0.64	0.89	1.25	1.17	1.22	1.56	1.12	1.00	0.83	0.73	0.69	0.44	0.60	0.56	0.49	0.31	0.24	0.18
	29	0.50	0.50	0.58	0.53	0.54	0.59	0.63	0.97	0.94	1.11	1.15	1.27	1.01	0.83	0.80	0.88	0.77	0.43	0.39	0.27	0.23	0.17	0.13	0.08
7	25	0.60	0.67	0.77	1.00	1.15	1.25	1.27	1.30	1.45	1.51	1.53	1.58	1.60	1.53	1.48	1.37	1.21	0.97	0.91	0.88	0.84	0.73	0.69	0.44
	29	0.50	0.53	0.58	0.62	0.70	0.78	0.81	0.90	0.92	1.00	1.20	1.28	1.30	1.28	1.23	1.18	1.08	0.98	0.83	0.74	0.72	0.61	0.57	0.49
	33	0.50	0.52	0.54	0.63	0.68	0.72	0.75	0.80	0.86	0.92	1.11	1.23	1.27	1.31	1.33	1.40	1.37	1.25	1.11	0.99	0.87	0.74	0.65	0.43
8	25	0.30	0.32	0.34	0.33	0.35	0.40	0.48	0.73	0.85	0.92	1.10	1.18	0.78	0.71	0.69	0.65	0.41	0.38	0.36	0.32	0.30	0.28	0.26	0.23
	29	0.49	0.50	0.53	0.53	0.55	0.61	0.67	0.91	1.07	1.12	1.33	1.35	0.99	0.92	0.88	0.86	0.73	0.48	0.40	0.35	0.33	0.34	0.32	0.30

b. Optimasi pertumbuhan bakteribiogrout pada medium B4 urin

Jam ke-		Absorbansi/ Kepadatan Sel																							
		1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	10.00	11.00	12.00	13.00	14.00	15.00	16.00	17.00	18.00	19.00	20.00	21.00	22.00	23.00	24.00
Temperatur 25°C	pH 4	0.07	0.07	0.08	0.09	0.09	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.16	0.13	0.13	0.12	0.10	0.09	0.07	0.06	0.05	0.04
	pH 5	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09	0.10	0.12	0.13	0.10	0.08	0.08	0.07	0.08	0.04
	pH 6	0.03	0.05	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.10	0.11	0.11	0.16	0.12	0.13	0.16	0.13	0.11	0.10	0.08	0.05	0.02
	pH 7	0.01	0.03	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12	0.12	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.06	0.05
	pH 8	0.07	0.08	0.10	0.12	0.13	0.14	0.14	0.15	0.16	0.16	0.16	0.17	0.17	0.17	0.14	0.14	0.14	0.10	0.10	0.09	0.07	0.07	0.07	0.03
	pH 9	0.02	0.02	0.04	0.07	0.09	0.10	0.10	0.11	0.13	0.13	0.17	0.18	0.19	0.19	0.10	0.08	0.07	0.05	0.04	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01

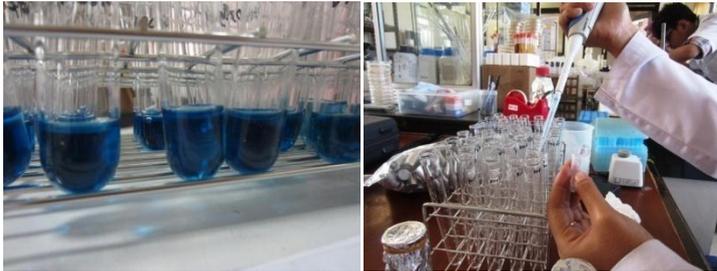
c. Uji Bradford

Konsentrasi	Standart		
	BSA	B4 Urea	B4 Urin
0	0.00	0.00	0.00
0.1	0.19	0.11	0.11
0.2	0.31	0.21	0.23
0.3	0.43	0.30	0.35
0.4	0.52	0.40	0.40
0.5	0.75	0.41	0.48
0.6	0.89	0.51	0.51
0.7	0.99	0.62	0.62
0.8	1.28	0.73	0.71
0.9	1.41	0.83	0.80
1	1.50	0.93	0.90
Rata-rata		0.456636	0.462818

Lampiran 3: Tabel Pengamatan Aplikasi *Biogrouting*

Pembentukan Mineral Kalsit		Time B4 Urea	Pembentukan Mineral Kalsit		Time B4 Urine	Pembentukan Mineral Kalsit		Time Kontrol
pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)	
	25	I		25	I		25	I
7	+		7	-		7	-	
8	+		8	-		8	-	
9	+		9	+		9	-	
Massa(gr)		Time B4 Urea	Massa(gr)		Time B4 Urine	Massa(gr)		Time Kontrol
pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)		pH	Temperatur(°C)	
	25	II		25	II		25	II
7	150		7	150		7	0	
8	150		8	150		8	0	
9	150		9	150		9	0	
*Proses sementasi berlangsung sempurna			*Proses sementasi berlangsung kurang sempurna			Tidak terjadi sementasi		

Lampiran 4: Foto Penelitian



Gambar 1. Uji Aktifitas Urease



Gambar 2. Sampel SDS Page



Gambar 3. Uji Bradford



(a) (b)

Gambar 4.(a)Aplikasi Sederhana *Biogrouting*(b)Pembentukan Kalsit



Gambar 5. Pengukuran pH Pasir Aplikasi *Biogrouting*

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

