

## Optimasi Produksi dan Karakterisasi Urease dari Isolat Lahan Pertanian Jombang, Jawa Timur

Annida Haqq(1), Endry Nugroho Prasetyo(2)

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember

[nida.haqq@gmail.com](mailto:nida.haqq@gmail.com) (1), [endry@bio.its.ac.id](mailto:endry@bio.its.ac.id) (2)

### ABSTRAK

Urease merupakan enzim yang mampu mengkatalisis reaksi urea menjadi karbon dioksida dan amonia. Mikroba yang mampu memproduksi urease disebut dengan mikroba ureolitik. Faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi mikroba ureolitik dalam memproduksi urease antara lain pH lingkungan, suhu lingkungan, dan konsentrasi substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi urin sapi paling optimum pada reaksi urease untuk memperoleh aktivitas paling tinggi. Penggunaan urin sapi sebagai substrat dalam reaksi urease pada penelitian ini didukung oleh limbah urin yang kurang dikelola dengan baik. Produksi urease dilakukan menggunakan media *Urea broth* dengan variasi konsentrasi urin sapi yaitu 0,5; 2,5; 5; 7,5; dan 10(v/v). Uji aktivitas urease dan uji kadar protein masing-masing menggunakan metode Nessler dan Bradford. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Urea broth* dengan konsentrasi urin sapi 0,5% memiliki aktivitas urease paling tinggi yaitu sebesar 37,74 U/mL dengan kadar protein 0,029 mg/mL, sedangkan aktivitas urease kontrol hanya sebesar 25,86 U/mL.

**Kata Kunci** : mikroba ureolitik, urease, urin.

### ABSTRACT

Urease is an enzyme that is able to catalyze the reaction of urea to carbon dioxide and ammonia. Microbes that are able to produce urease are called ureolytic microbes. Environmental factors that can influence ureolytic microbes in producing urease include environmental pH, environmental temperature, and substrate concentration. This research aims to determine the optimum concentration of cow urine in the urease reaction to obtain the highest activity. The use of cow urine as a substrate in the urease reaction in this study is supported by urine waste that is not managed properly. Urease production is carried out using *Urea broth* media with variations in cow urine concentration, namely 0.5; 2.5; 5; 7.5; and 10(v/v). The urease activity test and protein content test used the Nessler and Bradford methods respectively. The results showed that *Urea broth* with a cow urine concentration of 0.5% had the highest urease activity, namely 37.74 U/mL with a protein content of 0.029 mg/mL, while the control urease activity was only 25.86 U/mL.

**Keywords** : microbes, urease, urine

## I. PENDAHULUAN

### 1. Latar Belakang

Urease (EC 3.5.1.15) merupakan salah satu enzim yang mengandung nikel dan berfungsi mengkatalisis reaksi urea menjadi karbon dioksida dan amonia. Reaksi urease dapat menyebabkan terjadinya peningkatan pH pada media sekitarnya (Cheng and Cord-Ruwisch, 2013; Mora and Arioli, 2014). Urease bersifat heteropolimer dan terdiri dari tiga polipeptida serta termasuk dalam kelompok amidohidrolase. Amidohidrolase adalah salah satu jenis enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan amino (Aimin, Tingfeng and Rong, 2007). Sumber urease dapat ditemukan dari mikroba, tanaman, dan hewan tertentu. Mikroba merupakan salah satu sumber urease yang paling banyak diteliti sebab sifat mikroba yang relatif mudah tumbuh, mampu berkembangbiak secara cepat, jumlah enzim yang diproduksi tinggi, dan pertumbuhannya yang mudah dikontrol. Mikroba penghasil urease ini disebut sebagai mikroba ureolitik (Burbank *et al.*, 2012). Pemanfaatan urease maupun mikroba ureolitik di berbagai bidang telah banyak diteliti. Pada bidang konstruksi bangunan, hasil katalisis urease yaitu kalsium karbonat dapat berfungsi untuk menutupi keretakan yang terjadi pada beton dan memperkuat struktur tanah yang lembek menjadi lebih kuat (Almajed *et al.*, 2020; Alotaibi *et al.*, 2022). Pada bidang remediasi mikroba ureolitik mampu mendegradasi dan mengendapkan logam berat sehingga dapat dijadikan sebagai agen bioremediasi (Zusfahair *et al.*, 2018). Eksplorasi habitat mikroba ureolitik di beberapa tempat telah dilakukan, diantaranya pada limbah perairan (Varalakshmi, 2014), tanah pembuangan nitrogen (Mekonnen *et al.*, 2021), dan pegunungan maupun goa berkapur (Armstrong *et al.*, 2016). Lahan pertanian merupakan salah satu habitat yang baik bagi pertumbuhan mikroba ureolitik sebab pada tanah di lahan pertanian umumnya ditambahkan pupuk berbahan dasar urea oleh petani sebagai nutrisi tanaman. Menumpuknya pupuk yang mengandung urea pada tanah menyebabkan mikroba ureolitik dapat tumbuh dengan baik sebab urea yang berasal dari pupuk dapat dimanfaatkan oleh mikroba ureolitik sebagai sumber energi (Mekonnen *et al.*, 2021; Alotaibi *et al.*, 2022). Produksi urease oleh bakteri ureolitik di dalam tanah juga dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor. Hal ini dapat diinduksi dengan adanya urea dan dihambat dengan adanya senyawa amonia dan nitrogen (Mobley, Island and Hausinger, 1995). Berbagai faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi produksi urease perlu dipahami lebih lanjut. Faktor lingkungan yang mempengaruhi produksi antara lain berupa pH, suhu, dan konsentrasi substrat. Penelitian ini berfokus untuk mengetahui konsentrasi urin sapi paling optimum pada reaksi urease untuk memperoleh aktivitas paling tinggi. Penggunaan urin sapi sebagai substrat dalam reaksi urease pada penelitian ini didukung oleh limbah urin yang kurang dikelola dengan baik oleh masyarakat sehingga dapat menimbulkan berbagai pencemaran. Urease yang telah diperoleh selanjutnya dipurifikasi menggunakan Amonium Sulfat hingga diperoleh fraksi pengendapan yang tepat sehingga menghasilkan aktivitas enzim maksimum.

### 2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan masalah yaitu,

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi urin sapi terhadap produksi dan aktivitas urease yang diproduksi oleh bakteri ureolitik tanah lahan pertanian?
2. Bagaimana pengaruh purifikasi Amonium Sulfat terhadap aktivitas urease yang diproduksi oleh bakteri ureolitik tanah lahan pertanian?

### 3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu,

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi urin sapi(%) terhadap produksi dan aktivitas urease yang dihasilkan oleh bakteri ureolitik tanah lahan pertanian.

2. Untuk mengetahui nilai aktivitas urease (U/mL) yang diproduksi oleh bakteri ureolitik tanah lahan pertanian.
3. Untuk mengetahui pengaruh purifikasi Amonium Sulfat terhadap aktivitas urease (U/mg) yang diproduksi oleh bakteri ureolitik tanah lahan pertanian.

#### 4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum untuk produksi urease sehingga terjadi efisiensi produksi yang dapat mengurangi biaya produksi enzim. Selain itu, kondisi produksi yang telah optimum dapat dijadikan dasar pemanfaatan dan aplikasi urease maupun mikroba ureolitik pada sektor sipil, industri, maupun bioteknologi..

## II. METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan yaitu dimulai pada November hingga Desember 2023 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Program Studi Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya.

### Rancangan Penelitian atau Model

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif yang mengamati pengaruh variasi konsentrasi urin sapi (%) terhadap aktivitas urease (U/mL). Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor. Faktor yang digunakan adalah konsentrasi urin sapi (%) yang terdiri dari 6 taraf dengan 2 kali pengulangan sehingga diperoleh 12 kombinasi perlakuan. Respon yang diamati adalah aktivitas urease (U/mL). Optimasi dilakukan pada taraf konsentrasi urin sapi 0,5; 2,5; 5; 7,5; 10; dan 12,5 (%). Aktivitas urease (U/mL) diperoleh dari rumus sebagai berikut,

$$\text{Aktivitas (U/mL)} = \frac{\text{Slope absorbansi}}{\text{Slope kurva standar A.sulfat}} \times \text{pengenceran enzim}$$

### Bahan dan Peralatan

Alat dan bahan yang digunakan adalah urea komersil, *Urea Agar Base (Christensen)*, isolat ureolitik, akuades, *Nutrient Broth*,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , *Tris-base*, Reagen *Nessler*, aluminium foil, kapas lemak, kasa steril, *plastic wrap*, tabung reaksi, cawan Petri, gelas ukur, mikropipet, *vortex*, *laminar air flow (LAF)*, botol semprot, neraca analitik, pembakar Bunsen, *rotary shaker*, kuvet, sentrifus, kertas label, dan autoklaf.

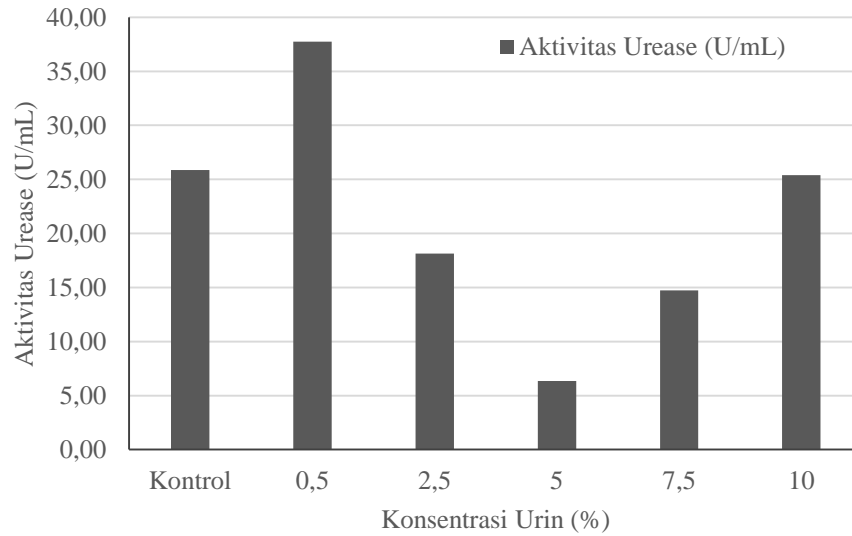
### Tahapan Penelitian

(1) Aklimatisasi bakteri pada media yang mengandung urin sapi, (2) Produksi *crude* urease oleh bakteri ureolitik pada media *urea broth (Nutrient Broth, NaHCO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)* dengan variasi konsentrasi urin sapi, (3) Uji aktivitas urease menggunakan metode *Nessler*, (4) Uji Kadar Protein menggunakan metode *Bradford*, dan (5) Purifikasi parsial urease menggunakan Amonium Sulfat, dan (5) Olah data

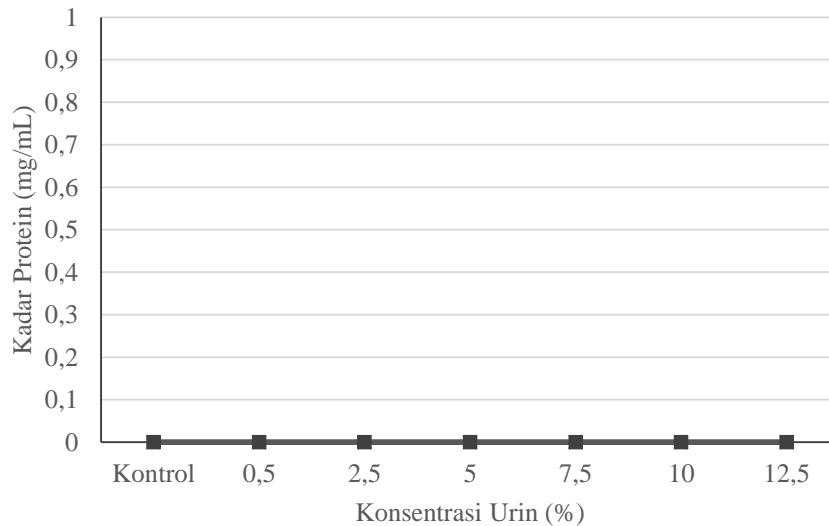
## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Pengaruh Konsentrasi Urin terhadap Aktivitas Urease (U/mL)

Produksi urease dilakukan menggunakan bakteri ureolitik yang diisolasi dari tanah Lahan Pertanian di Kecamatan Diwek, Kabupaten Jombang. Tanah di lahan pertanian tersebut merupakan lahan yang seringkali diberi pupuk urea oleh para petani dengan tujuan menyuburkan tanah. Gambar 1 menunjukkan pengaruh konsentrasi urin terhadap aktivitas urease (U/mL) yang dihasilkan oleh isolat bakteri tanah pertanian.



**Gambar 1.** Aktivitas *Crude* Urease (U/mL) yang dihasilkan oleh Bakteri Ureolitik pada Variasi Konsentrasi Urin Sapi(%)



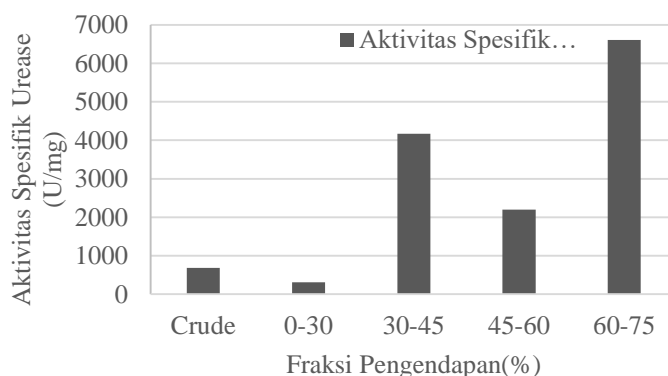
**Gambar 2.** Kadar Protein Urease yang dihasilkan oleh Bakteri Ureolitik pada Variasi Konsentrasi Urin Sapi (%)

Aktivitas *crude* urease ditemukan paling tinggi yaitu sebesar 37,74 U/mL pada *urea broth* dengan konsentrasi urin sapi 0,5%, sedangkan aktivitas urease kontrol hanya sebesar 25,86 U/mL (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa substrat urin sapi dapat meningkatkan aktivitas *crude* urease sebanyak 68,52% dibandingkan kontrol. Kontrol yang digunakan adalah media dengan substrat berupa urea komersial. Aktivitas urease sebesar 37,74 U/mL mengindikasikan bahwa 1 unit urease dapat melepaskan 37,73  $\mu$ mol amonia ( $\text{NH}_3$ ) dalam 1 menit (Destari and Prasetyo, 2015). Mekanisme reaksi urease terjadi dengan proses pengubahan urea menjadi amonia dan karbondioksida. Kemudian aktivitas urease dihitung berdasarkan jumlah amonia yang dihasilkan menggunakan reagen *Nessler* untuk menghasilkan kompleks warna kuning kecoklatan (Zusfahair *et al.*, 2018). Hidrolisis urea maupun urin oleh enzim dapat terjadi dengan optimum apabila kadar substrat tersedia dalam jumlah yang cukup, sehingga hasil reaksi dapat diperoleh secara optimal. Adanya konsentrasi substrat yang terlalu tinggi menyebabkan kerja enzim tidak mampu bekerja secara optimal, begitu juga apabila

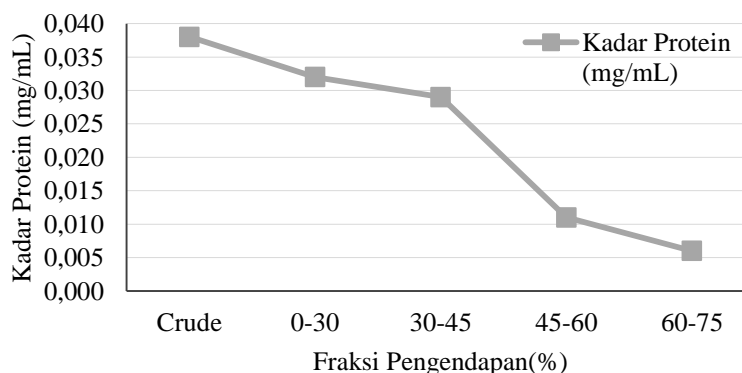
konsentrasi substrat terlalu rendah (Ganda, Chairul and Hafidawati, 2014; Linda *et al.*, 2021). Berdasarkan Gambar 2, kadar protein pada *crude* urease tidak berpengaruh terhadap aktivitas enzim sebab pada *crude* urease masih terdapat pengotor berupa protein lain. Oleh karena itu diperlukan purifikasi enzim untuk menghilangkan pengotor lain sehingga didapatkan enzim yang lebih murni dan aktivitas enzim yang lebih besar (Zusfahair *et al.*, 2018).

## 2. Purifikasi Urease menggunakan Amonium Sulfat

*Crude* urease pada konsentrasi urin sapi 0,5% kemudian dilakukan pemurnian menggunakan metode pengendapan amonium sulfat untuk menghilangkan pengotor pada *crude*. Variasi konsentrasi amonium sulfat yang digunakan mulai dari 0-30, 40-45, 45-60, hingga 60-75% dengan total empat fraksi pengendapan. Urease yang telah dimurnikan kemudian dilakukan perhitungan aktivitas spesifik (U/mg) dan kadar protein (mg/mL) dengan hasil yang disajikan masing-masing pada Gambar 3 dan 4.



**Gambar 3.** Aktivitas Spesifik Urease (U/mg) yang dihasilkan oleh Bakteri Ureolitik pada setiap Fraksi Pengendapan Amonium Sulfat(%)



**Gambar 4.** Kadar Protein Urease yang dihasilkan oleh Bakteri Ureolitik pada setiap Fraksi Pengendapan Amonium Sulfat(%)

Fractions precipitation 60-75% ammonium sulfate shows the highest specific activity (U/mg) compared to other fractions, reaching 6.608,88 U/mg with an enzyme activity of 39,65 U/mL. This indicates that the 60-75% fraction has the highest urease content and the fewest other contaminants. The addition of ammonium sulfate to the *crude enzyme* can reduce protein solubility because ammonium sulfate can bind more water compared to protein. This causes the attraction between protein molecules and water to become weaker. Conversely, the interaction between protein molecules themselves will increase (hydrophobic interaction) and cause

protein tersebut mengendap sehingga pengotor/inhibitor reaksi urease (dalam bentuk protein selain urease) menjadi berkurang (Fitria *et al.*, 2017; Hapsari *et al.*, 2021). Oleh karena itu, semakin tinggi fraksi pengendapan amonium sulfat maka kadar protein pada enzim semakin kecil (Gambar 4). Semakin tinggi konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan maka terjadinya pengendapan protein/pengotor semakin baik. Namun amonium sulfat memiliki titik kejenuhannya. Gambar 3 menunjukkan bahwa titik kejenuhan amonium sulfat terhadap urease adalah pada konsentrasi 60-75%. Nilai aktivitas spesifik yang semakin besar menunjukkan kemurnian enzim dan efisiensi kerja enzim semakin tinggi. Hal ini disebabkan laju reaksi enzim (U/mL) tetap sama, namun kadar protein (mg/mL) semakin kecil karena pengotor berupa inhibitor yang dapat menginterferensi kerja enzim telah berkurang (Robinson, 2015).

#### IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu:

1. Konsentrasi urin sapi pada saat fermentasi oleh bakteri ureolitik berpengaruh terhadap aktivitas urease. Semakin tinggi konsentrasi urin sapi(%) yang ditambahkan, maka aktivitas urease(U/mL) semakin rendah.
2. Aktivitas urease maksimum oleh bakteri ureolitik dari tanah lahan pertanian diperoleh pada *urea broth* menggunakan konsentrasi urin sapi 0,5% dengan aktivitas sebesar 37,74 U/mL.
3. Kadar Amonium Sulfat berpengaruh terhadap aktivitas spesifik urease (U/mg). Amonium Sulfat sebesar 60-75% mampu memberikan aktivitas spesifik urease sebesar 6.608,88 U/mg.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Aimin, L., Tingfeng, L. and Rong, F. (2007) 'Amidohydrolase Superfamily', eLS, (November). doi: 10.1002/9780470015902.a0020546.
- Almajed, A. et al. (2020) 'Enzyme-Induced Carbonate Precipitation (EICP)-Based methods for ecofriendly stabilization of different types of natural sands', *Journal of Cleaner Production*, 274, p. 122627. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122627.
- Alotaibi, E. et al. (2022) 'Life cycle assessment of biocemented sands using enzyme induced carbonate precipitation (EICP) for soil stabilization applications', *Scientific Reports*, 12(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-022-09723-7.
- Armstrong, I. et al. (2016) 'SHORT COMMUNICATION Screening for Urease-Producing Bacteria from Limestone Caves of Sarawak', *Borneo Journal of Resource Science and Technology*, 6(1), pp. 37–45.
- Burbank, M. B. et al. (2012) 'Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was Precipitated by Indigenous Bacteria', *Geomicrobiology Journal*, 29(4), pp. 389–395. doi: 10.1080/01490451.2011.575913.
- Cheng, L. and Cord-Ruwisch, R. (2013) 'Selective enrichment and production of highly urease active bacteria by non-sterile (open) chemostat culture', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(10), pp. 1095–1104. doi: 10.1007/s10295-013-1310-6.
- Destari, D. N. and Prasetyo, E. N. (2015) 'Production and Characterization of Urease from *Bacillus sp.* SK II-5 Thermophilic Bacteria', 4(1).
- Fitria, F. et al. (2017) 'Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Xilanase dari Bakteri Laut *Bacillus safencis* strain LBF P20 Asal Pulau Pari Jakarta', *Agritech*, 37(1), p. 31. doi: 10.22146/agritech.17004.
- Ganda, D. P., Chairul and Hafidawati (2014) 'Variasi Konsentrasi Enzim Stargentm 002 Pada Proses Sakarifikasi Dan Fermentasi Serentak Pati Sorgum Menjadi Bioetanol',

Jurnal Online Mahasiswa, 1(1), p. 3. Available at: <https://media.neliti.com/media/publications/201843-varasi-konsentrasi-enzim-stargen-tm-002.pdf>.

- Hapsari, M. W. et al. (2021) 'ISOLASI, PURIFIKASI PARSIAL DAN KARAKTERISASI ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)', *Science Technology and Management Journal*, 1(2), pp. 71–79. doi: 10.53416/stmj.v1i2.37.
- Linda, T. M. et al. (2021) 'Aktivitas Urease dan Pembentukan Kalsium Karbonat oleh Bakteri Ureolitik', *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*, 11(1), pp. 139–143. doi: 10.26740/lenterabio.v11n1.p139-143.
- Mekonnen, E. et al. (2021) 'Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria', *International Journal of Microbiology*, 2021. doi: 10.1155/2021/8888641.
- Mobley, H. L. T., Island, M. D. and Hausinger, R. P. (1995) 'Molecular biology of microbial ureases', *Microbiological Reviews*, 59(3), pp. 451–480. doi: 10.1128/mmbr.59.3.451-480.1995.
- Mora, D. and Arioli, S. (2014) 'Microbial Urease in Health and Disease', *PLoS Pathogens*, 10(12). doi: 10.1371/journal.ppat.1004472.
- Robinson, P. K. (2015) 'Enzymes: principles and biotechnological applications', *Essays in Biochemistry*, 59, pp. 1–41. doi: 10.1042/BSE0590001.
- Varalakshmi, V. and devi, A. (2014) 'Isolation and Characterization of Urease Utilizing Bacteria to Produce Biocement', *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(4), pp. 52–57. doi: 10.9790/2402-08425257.
- Zusfahair, Z. et al. (2018) 'Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Urease dari Biji Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* subsp *sesquipedalis* L.)', *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 14(1), p. 72. doi: 10.20961/alchemy.14.1.13000.72-83.

Accepted Date	Revised Date	Decided Date	Accepted to Publish
22 Desember 2024	08 Januari 2025	29 Januari 2025	Ya