

## VIABILITY AND PRODUCTION CALCIFYING BACTERIAL ENDOSPORE ON SAND-CEMENT CARRIER

Devinta Apriliani<sup>2</sup> dan Enny Zulaika<sup>1\*</sup>

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Jl. Raya ITS, Sukolilo, Surabaya 60111 Indonesia

\*Email: [enny@bio.its.ac.id](mailto:enny@bio.its.ac.id), [ennyzulaika123@gmail.com](mailto:ennyzulaika123@gmail.com)

### Abstract

Carbonatogenic bacteria have the ability ability to precipitate calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) and many calcareous areas are found. Some of its species formed endosporas which resistant to harsh physical condition such as very alkaline pH. The objectives of this study were to obtain spore biomass and determine endosporas viability in tested carrier media such as sand-cement. The tested isolates were *Bacillus* JA1, JB3, SU1, AK4, *Lysinibacillus* JB2, and *Sporosarcina* JA4. The production of endosporas was carried out on yeast urea broth with a temperature treatment of 70°C for 20 minutes. The formed endosporas were stored in carrier medium of sand, cement, and a mixture of cement sand. Spore viability was conducted using total plate count method. The results showed that all isolates were able to produce endosporas with the highest endosporas dry biomass is *Bacillus* AK4 which was 196 mg/L. After 2 hours of storage, endosporas were still able to grow by forming colonies on nutrient agar media.

**Keywords:** carbonatogenic bacteria; carrier media; YU; endospora; viability

### Pendahuluan

Bakteri karbonatogenik mampu menghasilkan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), dapat ditemukan di tanah, perairan, pegunungan kapur, gua-gua karst dan sedimen [1,2]. Bakteri yang diisolasi dari tanah kapur mampu hidup di lingkungan alkali dengan pH 7,6 - 8,6 [3], bakteri tersebut berpotensi digunakan sebagai agen biobeton sebab bahan baku beton mempunyai pH sangat alkali yaitu diatas 10 [4]. Biobeton dengan penambahan bakteri karbonatogenik mempunyai struktur konstruksi yang kuat dan tahan lama dengan kuat tekan lebih baik daripada beton tanpa bakteri [5].

*Bacillus* JA1, JB3, SU1, AK4, *Lysinibacillus* JB2, dan *Sporosarcina* JA4 merupakan bakteri karbonatogenik yang diisolasi dari pegunungan kapur [6]. Semua bakteri tersebut mampu membentuk endospora, yaitu suatu morfologi tidak aktif yang dibentuk oleh bakteri ketika berhadapan dengan stres lingkungan seperti kekurangan nutrisi, suhu tinggi atau pH alkali. Endospora memiliki keunggulan dapat bertahan hidup dalam keadaan tidak aktif sampai bertahun-tahun, tahan terhadap panas, kering dan paparan zat kimia [7], sehingga endospora pada bakteri lebih menguntungkan daripada sel vegetatif ketika diaplikasikan pada beton untuk

konstruksi bangunan yang memiliki kondisi lingkungan ekstrem tersebut [8].

Pembentukan endospora lebih optimal dilakukan dengan *shock treatment* suhu 70°C selama 20 menit pada media *Yeast Urea* (YU) *broth* dibandingkan media lain [9]. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi endospora dan mengetahui viabilitasnya pada media pembawa pasir-semen setelah 2 jam inkubasi.

### Bahan dan Metode

#### Isolat Bakteri Karbonatogenik

Isolat yang digunakan adalah *Bacillus* JA1, JB3, SU1, AK4, *Lysinibacillus* JB2 dan *Sporosarcina* JA4 yang berasal dari bukit Jaddih, Bangkalan, gua Akbar, Tuban dan Suci, kawasan perbukitan kapur Gresik, Jawa Timur, Indonesia [6].

#### Produksi Endospora pada Media YU Broth

Isolat dikultur pada media *Yeast Urea* (YU) *broth* dengan komposisi per liter 3 g NB; 2,12 g  $\text{NaHCO}_3$  dan 10 g urea. Koloni penuh dari tabung reaksi diinokulasi secara aseptis ke dalam 750 ml media YU *broth*, diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari diatas *shaker* (100 rpm). Selanjutnya dilakukan pemanasan di dalam *waterbath* pada suhu 70°C selama 20

menit untuk melisis sel bakteri. Sebanyak 1 ml digunakan untuk uji viabilitas endospora dan sisa kultur dipanen endosporanya untuk disimpan di media pasir-semen [8].

### Konfirmasi, Kepadatan dan Viabilitas Endospora

Konfirmasi terbentuknya endospora dilakukan dengan pewarnaan *malachite green*. Indikasi keberhasilan terbentuknya endoendospora adalah 90% sel berwarna hijau yang menunjukkan terbentuknya endoendospora [8].

Kepadatan endospora dihitung menggunakan haemocytometer. Keberadaan endospora diamati di bawah mikroskop dengan pewarnaan *malachite green*. Sel bakteri yang mengandung ruang warna hijau adalah endospora selanjutnya dihitung menggunakan *hand tally counter* [8]. Uji viabilitas endospora dilakukan dengan menumbuhkan 100µl suspensi endospora pada media NA-agar cawan dengan metode *pour plate*, diinkubasi 24 jam atau sampai terbentuk koloni tunggal yang menandakan endospora mampu membentuk sel vegetatif kembali. Selanjutnya 1 ose isolat diperiksa ulang kemampuannya membentuk endospora dengan pewarnaan *malachite green* [10].

### Biomassa Endospora

Endospora dipanen dengan cara sentrifugasi 5.000 rpm selama 25 menit. Pelet endospora dicuci dua kali dengan 0,8% (b/v) NaCl [8]. Disaring dengan kertas saring whatman dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C hingga berat konstan [11], endospora yang telah kering ditimbang dengan neraca analitik.

### Media Pembawa

Media pembawa yang digunakan adalah pasir, semen dan campuran pasir semen dengan kontrol endospora tanpa media. Penyimpanan endospora dilakukan di dalam tabung reaksi steril dengan headspace 25% dan media pembawa 75%. Semua media pembawa perlakuan ditimbang dan disterilkan

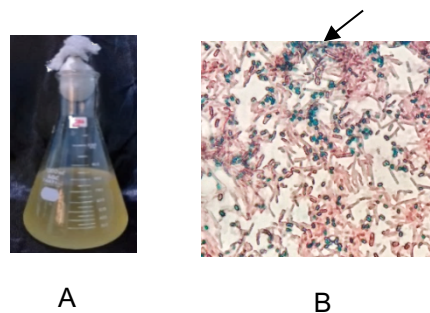
menggunakan autoklaf (121°C, 15 menit). Pada campuran media pembawa pasir semen dibuat 3 variasi dengan perbandingan pasir dan semen yaitu 1:1, 2:1 dan 1:2.

### Viabilitas Endospora pada Media Pembawa

Uji viabilitas dilakukan dengan cara mengambil 1 g media pembawa yang mengandung endospora ditambah 9 ml akuades steril sehingga didapatkan pengenceran  $10^{-1}$ . Pengenceran yang telah dilakukan diambil 100µL ditumbuhkan pada media NA-agar cawan dengan metode *pour plate*, diinkubasi 24 jam, viabilitas ditandai dengan pertumbuhan koloni. Koloni dihitung dengan parameter CFU/g media, apabila jumlah koloni lebih dari 300 CFU maka dilakukan pengenceran dan dilakukan preparasi seperti diatas sampai didapatkan jumlah koloni dengan rentang 30-300 CFU [8].

### Hasil dan Pembahasan Produksi Endospora

Semua isolat mampu tumbuh pada media YU *broth* dan membentuk endospora setelah diinkubasi 7 hari diatas *rotary shaker*. Pembentukan endospora menggunakan media YU *broth* mampu menciptakan kondisi kekurangan nutrisi bagi sel bakteri karbonatogenik sehingga membentuk struktur tidak aktif yaitu endospora (Gambar 1).



Gambar 1. Produksi endospora bakteri karbonatogenik (A. Kultur bakteri karbonatogenik pada media YU *broth*; B. Endospora dengan pewarnaan *malachite green*. Tanda panah menunjukkan endospora).

Bakteri melakukan proses sporulasi ketika berada dalam kondisi ekstrem seperti kekurangan nutrisi, komposisi mineral berlebihan dan suhu tinggi [12]. Berdasarkan penelitian [9], produksi endospora lebih tinggi pada media YU *broth* dibandingkan media CCP, sebab media CCP memiliki komposisi nutrisi yang lebih lengkap dibandingkan media YU *broth*. Sedangkan *shock treatment* suhu 70°C selama 20 menit dalam waterbath dapat menginduksi pembentukan endospora dan melisiskan sel vegetatif. Hal tersebut sesuai dengan penelitian [11] yang menyatakan *shock treatment* 80°C selama 20 menit dalam waterbath mampu menghasilkan endospora.

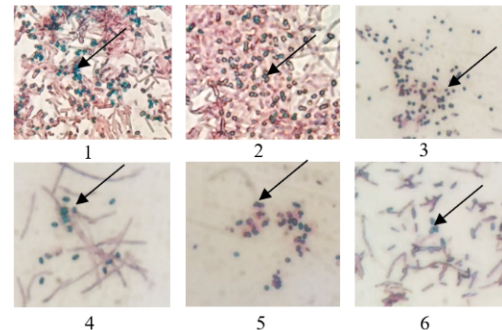
### Kepadatan dan Viabilitas Endospora

Endospora bakteri karbonatogenik terbentuk karena nutrisi yang tersedia pada media terbatas, bakteri akan merespon hal tersebut dengan membentuk endospora, proses ini disebut sporulasi. Sporulasi merupakan strategi bertahan hidup bagi bakteri ketika menghadapi kondisi lingkungan yang ekstrem, seperti nutrisi yang terbatas, suhu tinggi, kekeringan dan paparan senyawa antimikroba [13].

Kepadatan endospora yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh perlakuan yang bervariasi. Menurut penelitian [14], endospora yang dihasilkan pada media *Mueller Hinton* (MH) dan *Trypton Soy Broth* (TS) adalah  $10^8$  dan  $10^7$  karena kedua media ini memiliki nilai pH 7,3 yang lebih tinggi dari pH media YU *broth*. pH dapat mempengaruhi keadaan muatan membran sel, mengubah permeabilitas membran sel, mempengaruhi penyerapan nutrisi dan pembentukan metabolit. Ketika nilai pH 7 atau 8 akan mempengaruhi jumlah sel total bakteri menjadi rendah. Selain itu, suhu juga mempengaruhi kepadatan sel yang dihasilkan [15]. Pada penelitian [16], perubahan suhu yang drastis yaitu dari suhu 65°C kemudian dicuci dalam *ice-cold sterile HPLC water* dapat menghasilkan endospora sampai dengan  $10^9$  endospora/mL.

Pada penelitian ini, kepadatan endospora yang diproduksi di media YU *broth* mencapai kepadatan  $10^6$ . *Bacillus* AK4 memiliki kepadatan tertinggi yaitu  $7,1 \times 10^6$ , secara keseluruhan kepadatan endospora dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Semua isolat mampu membentuk endospora yang ditandai dengan bentuk organel berwarna hijau setelah diberi pewarnaan *malachite green* (Gambar 2).



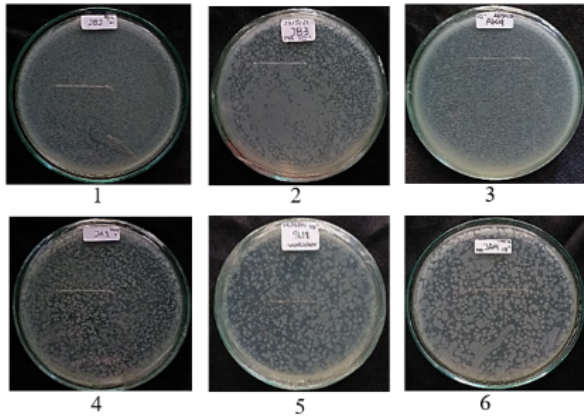
Gambar 2. Endospora bakteri karbonatogenik setelah inkubasi 7 hari. (1. *Lysinibacillus* JB2; 2. *Bacillus* JB3; 3. *Bacillus* AK4; 4. *Bacillus* JA1; 5. *Bacillus* SU1; 6. *Sporosarcina* JA4.

\*Tanda panah menunjukkan endospora)

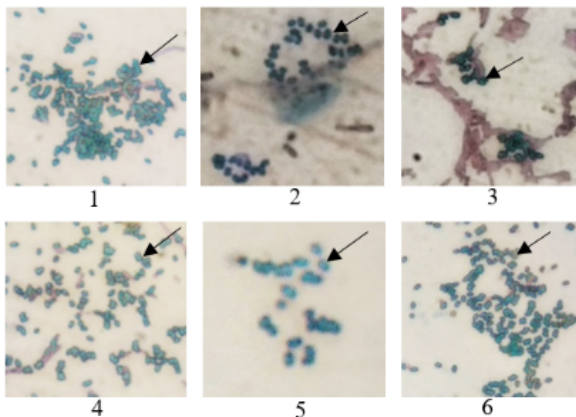
Tabel 1. Kepadatan endospora yang dihasilkan pada media YU *broth*

No.	Isolat	Kepadatan endospora/ml $\times 10^6$
1.	<i>Lysinibacillus</i> JB2	4,5
2.	<i>Bacillus</i> JB3	1,7
3.	<i>Bacillus</i> AK4	7,1
4.	<i>Bacillus</i> JA1	1,1
5.	<i>Bacillus</i> SU1	5,6
6.	<i>Sporosarcina</i> JA4	3,5

Viabilitas endospora yang ditumbuhkan kembali pada media NA mampu membentuk koloni sel vegetatif, setelah dilakukan pewarnaan kembali menunjukkan sel vegetatif mampu membentuk endospora (Gambar 3 dan Gambar 4).



Gambar 3. Sel vegetatif yang ditumbuhkan kembali pada media NA (1. *Lysinibacillus* JB2; 2. *Bacillus* JB3; 3. *Bacillus* AK4; 4. *Bacillus* JA1; 5. *Bacillus* SU1; 6. *Sporosarcina* JA4).



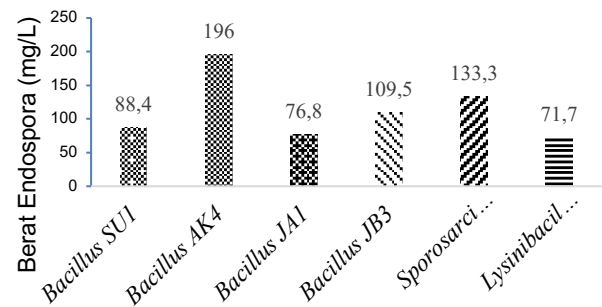
Gambar 4. Viabilitas dari endospora, tanda panah menunjukkan endospora (1. *Lysinibacillus* JB2; 2. *Bacillus* JB3; 3. *Bacillus* AK4; 4. *Bacillus* JA1; 5. *Bacillus* SU1; 6. *Sporosarcina* JA4).

Endospora mampu tumbuh kembali menjadi sel vegetatif ketika nutrisi dan kondisi lingkungan mendukung untuk pertumbuhan, yaitu dapat berubah secara cepat dari bentuk dorman menjadi sel vegetatif secara penuh ketika terdapat nutrisi. Endospora akan mengalami rehidrasi dan membongkar struktur pelindungnya, mengaktifkan kembali sintesis makromolekul, melepaskan mantel endospora, kemudian melanjutkan pertumbuhan vegetatifnya [17]. Selain ketersediaan nutrisi, germinasi endospora juga dipicu oleh agen non-nutrient seperti CaDPA, surfaktan atau dodecylamine, dan perlakuan fisik seperti *hyperbaric treatment* [18]. Sel vegetatif isolat mampu membentuk endospora kembali setelah dikulturkan di media NA, karena bakteri telah mencapai umur lebih dari 48 jam dan nutrisi pada media sudah tidak mencukupi untuk

pertumbuhannya atau bakteri sudah tua umurnya sehingga bakteri merespon kekurangan nutrisi dengan membentuk endospora. Endospora merupakan bentuk pertahanan hidup terhadap stress lingkungan seperti kekurangan nutrisi, komposisi mineral tinggi, pH, suhu dan kepadatan sel yang tinggi. Endospora tahan pada suhu ekstrim disebabkan adanya faktor resistensi termasuk perlindungan DNA endospora oleh *small-acid soluble protein*, akumulasi kation divalen pada inti endospora, dehidrasi inti endospora, dan keberadaan asam dipicolinic (DPA) [20].

### Berat Kering Endospora

Berat kering endospora tertinggi terdapat pada isolat *Bacillus* AK4 dengan berat 196 mg/L. Berat kering endospora isolat yang lain dapat dilihat pada Gambar 5. Panen endospora dengan cara sentrifugasi membantu memisahkan endospora dari sel vegetatif dan debris [19]. Pencucian endospora dengan NaCl dapat membersihkan residu dan juga menciptakan kondisi lingkungan yang isotonic, hal ini penting dilakukan untuk memulihkan sel maupun endospora dari stress akibat tekanan osmosis [8].



Gambar 5. Berat kering endospora

### Viabilitas Endospora pada Media Pembawa

Endospora yang disimpan di media pembawa setelah 2 jam inkubasi, mampu tumbuh kembali pada media NA, isolat menghasilkan jumlah koloni berkisar  $10^2 - 10^5$  CFU/g media pembawa. Semua isolat pada kontrol dan media pembawa pasir menunjukkan jumlah koloni paling banyak (Tabel 2).

Kemampuan endospora tumbuh menjadi sel vegetatif, karena endospora memiliki struktur dan kemampuan resistensi yang tahan terhadap lingkungan ekstrem serta dapat bergerminasi kembali ketika dipicu adanya

nutrisi. Jumlah koloni yang paling banyak ada di media pembawa pasir, disebabkan pasir

Tabel 2. Viabilitas endospora setelah 2 jam inkubasi di media pembawa

Viabilitas isolat				
Isolat	Media	CFU/gr x 10 <sup>6</sup>	Media	CFU/gr x 10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus</i> AK4	Kontrol	1,11	Pasir:Semen 1:1	0,17
	Pasir	0,27	Pasir:Semen 1:2	0,03
	Semen	0,07	Pasir:Semen 2:1	0,09
<i>Sporocarcina</i> JA4	Kontrol	0,26	Pasir:Semen 1:1	0,13
	Pasir	0,92	Pasir:Semen 1:2	0,08
	Semen	0,04	Pasir:Semen 2:1	0,12
<i>Lysinibacillus</i> JB2	Kontrol	20,55	Pasir:Semen 1:1	0,51
	Pasir	10,10	Pasir:Semen 1:2	1,21
	Semen	1,68	Pasir:Semen 2:1	1,75
<i>Bacillus</i> JA1	Kontrol	0,13	Pasir:Semen 1:1	0,06
	Pasir	0,34	Pasir:Semen 1:2	0,005
	Semen	0,004	Pasir:Semen 2:1	0,005
<i>Bacillus</i> SU1	Kontrol	6,20	Pasir:Semen 1:1	1,57
	Pasir	5,83	Pasir:Semen 1:2	1,39
	Semen	1,49	Pasir:Semen 2:1	4,11
<i>Bacillus</i> JB3	Kontrol	0,03	Pasir:Semen 1:1	0,01
	Pasir	0,01	Pasir:Semen 1:2	0,01
	Semen	0,01	Pasir:Semen 2:1	0,01

memiliki rongga yang lebih besar dibandingkan semen sehingga endospora tetap mendapat ruangan dan lebih terlindungi dari gesekan media pembawa. Menurut [11], pasir memiliki rongga antar partikel yang lebih besar dari semen yaitu 4,75 mm sehingga dapat melindungi endospora bakteri. Sedangkan semen memiliki pori yang lebih kecil dan memiliki pH tinggi antara 12-13 dapat mengekspos bakteri ke lingkungan ekstrem dan memberikan kondisi stres fisik pada bakteri [21].

### Kesimpulan

Talaeikhozan, A. Keyvanfar, A. Shafaghat, A. Andalib, R. Majid, M.Z.A. Fulazzaky, M.A. Zin, R.M. Lee, C.T., Hussin, M.W. Hamzah, N. Marwar, N.F. and Haidar, H.I. 2014. A Review of Self-healing Concrete Research Development. *Journal of Environmental Treatment Techniques*. **2:1** 1-11.

Semua isolat bakteri karbonatogenik mampu membentuk endospora pada media YU broth dengan *shock treatment* suhu 70°C, 20 menit. *Bacillus* AK4 memproduksi endospora dengan berat kering tertinggi yaitu 196 mg/L. Setelah 2 jam inkubasi di media pembawa, semua isolat mampu tumbuh kembali di media NA dengan viabilitas tertinggi pada kontrol dan

media pembawa pasir yaitu sebesar 20,55 x 10<sup>6</sup> dan 10,10 x 10<sup>6</sup>.

### Daftar Pustaka:

Wei, S., Cui, H., Jiang, Z., Liu, H., He, H., and Fang, N. 2015. Biomineralization Processes Of Calcite Induced By Bacteria Isolated From Marine Sediments. *Brazilian journal of Microbiology*. **46:2** 455-464.

Tagavifar, M., Jang, S.H., Sharma, H., Wang, D., Chang, L.Y., Mohanty, K., and Pope, G.A.

2018. Effect of pH on Adsorption of Anionic Surfactants on Limestone: Experimental Study and Surface Complexation Modeling. *Colloids and Surfaces A*. **538** 549-558

Ivanov V., Chu J., and Stabnikov V. 2015. Basics of Construction Microbial Biotechnology. In: Pacheco Torgal F., Labrincha J., Diamanti M., Yu CP., Lee H. (eds) *Biotechnologies and Biomimetics for Civil Engineering*. Springer, Cham.

Rukmana, G dan Zulaika, E. 2017. Isolasi Bakteri Karbonoklastik dari Pegunungan Kapur. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. **6:2** 2337-3520.

Utomo, M.A.P dan Zulaika, E. 2018. Bakteri Karbonatogenik Sebagai Agen Biosemen Untuk Alternatif Memperbaiki Retakan Beton. *Tesis*. Departemen Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Xu, J and Wang, X. 2018. Self-Healing of Concrete Cracks by Use of Bacteria-Containing Low Alkali Cementitious Material. *Construction and Building Materials*. **167** 1-14.

Pungrasmi, W., Intarasoontron, J., Jongvivatsakul, P., and Likitlersuang, S. 2019. Evaluation of Microencapsulation Techniques for MICP Bacterial Spores Applied in Self-Healing Concrete. *Scientific Reports*. **9** 12484.

Duhita, C.K dan Zulaika, E. 2020. Aplikasi Endospora Bakteri Karbonoklastik pada Biobeton. *Tesis*. Departemen Biologi. Fakultas Sains dan Analitika Data. Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Harley, J.P and Prescott, L.M. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition*. USA: The McGraw-Hill Companies.

Xu, J., Wang, X., Zuo, J., and Liu, X. 2018. Self-Healing of Concrete Cracks by Ceramsite Loaded Microorganisms. *Advances in Materials Science and Engineering*. pg. 1-8.

Sella, S.R.B.R., Vandenberghe, L.P.S., and Socol, C.R. 2014. Life Cycle and Spore Resistance of Spore-Forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. **169** 931–939

Beskrovnaya, P., Sexton, D.L., Golmohammadzadeh, M., Hashimi, A and Tocheva, E.I. 2021. Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospores and Exospore Formation. *Front. Microbiol.* 12:630573

Cezario, N. S., Peres, M.V.N.N., Fruet, T.K., Nogueira, G.S.F., Toralles, B.M.T., and Cezario, D.D.S. 2018. Crack Filling in Concrete by Addition of *Bacillus subtilis* spores – Preliminary study. *Revista DYNA*. **85:205** 132-139

Jiang, L., Jia, G., Wang, Y and Liu, Z. 2020. Optimization of Sporulation and Germination Conditions of Functional Bacteria for Concrete Crack-Healing and Evaluation of their Repair Capacity. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **12** 10938-10948

Movahedi, S., and Waites, W. 2002. Cold Shock Response in Sporulating *Bacillus subtilis* and Its Effect on Spore Heat Resistance. *Journal of Bacteriology*. **184:19** 5275-5281

Mutlu, A., Charlotte K., Nils B., and Ilka B.B. 2020. A Spore Quality-Quantity Tradeoff Favors Diverse Sporulation Strategies in *Bacillus subtilis*. *ISME Journal*. **14** 2703-2714

Isoard, C.B., Véronique B., and Frédéric C. 2018. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. **42:5** 614–626

Cliff, J.B., Jarman, K.H., Valentine, N.B., Gollidge, S.L., Gaspar, D.J., Wunschel, D.S., and Wahl, K.L. 2005. Differentiation of Spores of *Bacillus subtilis* Grown in Different Media by Elemental Characterization Using Time-of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. **71:11** 6524–6530

Tan, I. S., and Kumaran S. R. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology reports*. **6:3** 212-215.

Jonkers, H.M., Thijssen, A., Muyzerb, G., Copuroglua, O., and Schlangena, E. 2010. Application of Bacteria as Self-healing Agent for The Development of Sustainable Concrete. *Ecological Engineering*. **36** 230-235