

Laporan Penelitian Tahun II
Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi
(HIBAH PEKERTI)

**Analisis Komunitas dan Filogeni Bakteri-
Bakteri Termofilik Sumber Air Panas di
Wilayah Jawa Tengah**

Oleh:

Agustina L. N. Aminin, M.Si.
Mukhammad Asy'ari, M.Si.
Dra. Nies Suci Mulyani, MS.

Didanai oleh:

**Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi (P4T), Direktorat Jenderal
Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat
Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi Nomor
321/P4T/DPPM/HPTP/IV/2004 tanggal 20 April 2004**

Universitas Diponegoro
Semarang
2005

**Halaman Pengesahan Laporan Akhir Penelitian
Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi**

1. Judul Penelitian : Analisis Komunitas dan Filogeni Bakteri-Bakteri Termofilik Sumber Air Panas di Wilayah Jawa Tengah

2. Ketua TPP
Nama : Agustina L.N.A, SSi., MSi./ NIP 132 231 662
Jabatan/Golongan : Asisten Ahli/ IIIA
Laboratorium/Jurusan: Laboratorium Biokimia/Jurusan Kimia
Fakultas/Universitas : FMIPA/Universitas Diponegoro – Semarang
Anggota TPP : 1. Mukhammad Asy'ari, SSi., M.Si.
2. Dra. Nies Suci M., MS.

3. Ketua TPM
Nama : Akhmaloka, Dipl.Biotech.,PhD./NIP. 131 690 330
Laboratorium/Jurusan: Laboratorium KBK Asam Nukleat dan Genetika Molekul / Departemen Kimia
Fakultas/Universitas : FMIPA/Institut Teknologi Bandung

4. Biaya Tahun I : Rp 68.000.000,00
Biaya dari DIKTI : Rp 68.000.000,00

5. Lama Penelitian : 7 (tujuh) bulan

6. Tempat Penelitian : 1. Laboratorium KBK Asam Nukleat dan Genetika Molekul (TPM)
2. Laboratorium Biokimia (TPP)



Wahid Setia Budi, M.S.
NIP. 131 459 438

Menyetujui
Ketua TPM

Akhmaloka, Dipl.Biotech.,PhD
NIP. 131 690 330

Semarang 25 November 2005

Ketua TPP

Agustina L.N.A, SSi., MSi.
NIP. 132 231 662



I. Riyanto, Sp.Bd.
NIP. 130 520 154

UPT-PUSTAK-UNDIP	
No. Daft:	233/KI/MIPA/C1
Tgl.	24.11.06

RINGKASAN

Analisis Komunitas dan Filogeni Bakteri-Bakteri Termofilik Sumber Air Panas di Wilayah Jawa Tengah

Agustina L.N. Aminin^{*)}, M.Asy'ari^{*)}, N.S. Mulyani^{*)}, Akhmaloka^{**)}

^{*)} Jurusan Kimia - F MIPA, Universitas Diponegoro, Semarang

^{**)} Departemen Kimia - F MIPA, Institut Teknologi Bandung, Bandung

Pada tahun pertama telah diperoleh 7 amplikon untuk dianalisis lebih lanjut. Produk PCR tersebut berupa fragmen DNA berukuran sekitar 400 pb yang diperoleh dari hasil amplifikasi fragmen gen 16S rRNA menggunakan templat DNA kromosom isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Gedong Songo, Dieng dan Baturraden. Ketujuh amplikon tersebut dianalisis menggunakan metode *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). DGGE dilakukan dalam berbagai kondisi terutama variasi gradien denaturasi gel, besar tegangan dan waktu yang digunakan dalam proses elektroforesis.

Hasil analisis DGGE terhadap fragmen DNA dari seluruh isolat Gedong Songo (GS) menunjukkan adanya 12 pita, tiga pita pada masing-masing isolat berada pada posisi yang sejajar. Tujuh pita DGGE dari Gedongsongo telah dianalisis urutan nukleotidanya, tiga pita menunjukkan kesamaan cukup tinggi dengan golongan *Thermus* sedangkan empat pita yang lain diduga merupakan spesies baru. Satu koloni tunggal dari GS (He) teridentifikasi sebagai *Geobacillus*.

Pada isolat Baturraden (BR), hasil DGGE menunjukkan adanya 10 pita. Tiga pita yang dianalisis urutan nukleotidanya menunjukkan tingkat kekerabatan tinggi dengan golongan *Bacillus* (*Geobacillus*), demikian pula dengan koloni tunggal dari BR yaitu Mbw termasuk golongan *Geobacillus*.

Hasil DGGE filtrat sel kawah Dieng menunjukkan adanya empat pita yang cukup dominan. Salah satu kultur Dieng yang ditumbuhkan pada media sulfobus (AD3), daerah variabel 9 dari gene 16S rRNA yang teramplifikasi dari DNA kromosomnya memiliki kesamaan tinggi dengan urutan nukleotida dari *Pseudomonas sp.*

Hasil uji enzim ekstraseluler terhadap kultur tunggal He, Mbw, dan AD3; menunjukkan bahwa He dan Mbw memiliki protease, amilase dan beta-galaktosidase. Sedangkan AD3 hanya positif memiliki protease ekstraseluler.

Kata kunci: DGGE, PCR, 16S rRNA

SUMMARY

Community and Phylogeny Analysis of Thermophilic Bacteria from Some Hot Springs in Central of Java

Agustina L.N.Aminin^{*)}, M.Asy'ari^{*)}, N.S. Mulyani^{*)}, Akhmaloka^{**)}

^{*)}Department of Chemistry – Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Diponegoro University, Semarang

^{**)}Department of Chemistry – Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Bandung Institute of Technology

Seven amplicons have been obtained at the first year, and need to be analyzed further. These PCR products were the gene fragments of 16S rRNA that amplified chromosomal DNA of thermophilic bacteria from Gedongsongo, Baturraden, and Dieng hot springs. These seven amplicons have been analyzed using DGGE method. The DGGE were optimized according to denaturing gradient, voltage, and time electrophoresis running.

The DGGE result from all Gedongsongo isolates revealed 12 different bands, three bands from each sample present at the same line. Seven bands have been re-PCR and sequenced. Three bands have a phylogenetic relationship with *Thermus sp.*, and the other four bands have been expected as novel bacteria. The single colony from GS (He) has a high similarity with *Geobacillus sp.* according to morphological study and 16S rRNA fragment gene sequence.

The Baturraden DGGE pattern showed there are 10 different bands. Three of them have been sequenced their nucleotide and having relationship with *Bacillus sp.* The Mbw isolate of Baturraden single colony is *Geobacillus sp.*

There are four predominant bands in Dieng DGGE gel. Isolate AD3 from Dieng that cultured in *Sulfolobus* medium showed a high similarity of their 16 rRNA gene fragment with *Pseudomonas sp.*

Extra cellular enzyme analysis of He, Mbw, and AD3 isolates revealed that He and Mbw have protease, amylase, and beta-galactosidase. However AD3 has only extra cellular protease.

Keywords: DGGE, PCR, 16S rRNA

DAFTAR ISI LAPORAN PENELITIAN

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI LAPORAN PENELITIAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. LANDASAN TEORETIK	4
BAB III. METODE PENELITIAN	14
BAB IV. HASIL PENELITIAN	16
BAB V. PEMBAHASAN HASIL PENELITIAN	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	37

--- oo 0 oo ---

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kami panjatkan kepada ALLOH SWT, sebab dengan Ridhonya telah menghantarkan kami dalam menyelesaikan penelitian Hibah Pekerti tahun II yang didanai oleh dana DP3M Dirjen Dikti tahun anggaran 2005/2006. Penelitian diimplementasikan bagi peningkatan kualitas dan kuantitas riset institusional di Laboratorium Biokimia – Jurusan Kimia, FMIPA – UNDIP Semarang. Dalam pelaksanaannya kami bekerjasama dengan Laboratorium KBK Asam Nukleat dan Genetika Molekul, Departemen Kimia, F-MIPA – ITB.

Kendatipun ada beberapa kendala dalam pelaksanaan penelitian, namun pada akhirnya kami mampu menyelesaikan dengan baik sesuai dengan rencana kerja dan jadwal yang telah disusun. Kami menyampaikan banyak terima kasih kepada kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan maupun dukungan bagi terlaksananya penelitian. Demikian pula halnya kepada pimpinan DP3M Dirjen Dikti, Lembaga Penelitian UNDIP, Fakultas MIPA, Departemen Kimia – ITB maupun Jurusan Kimia UNDIP yang telah memfasilitasi terlaksananya penelitian Hibah Pekerti.

Ketua Tim Peneliti

BAB I PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini eksplorasi terhadap bakteri ekstremofilik banyak dilakukan oleh berbagai pihak karena mikroba ini memiliki karakter unik terutama berkaitan dengan sifat dan manfaat enzim yang dikandungnya. Biokatalis jenis ini mampu memberi sumbangan besar baik untuk pengembangan ilmu dasar maupun bidang industri. Salah satu sumber potensial enzim termostabil adalah bakteri termofilik yang berasal dari sumber air panas. Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan sumber air panas, namun eksplorasi terhadap bakteri termofilik masih sangat terbatas. Dalam rangka mendapatkan informasi mengenai komunitas serta pohon filogeni bakteri-bakteri termofilik dari sumber-sumber air panas Indonesia, dalam penelitian ini akan dilakukan analisis terhadap sumber-sumber yang ada di Jawa Tengah. Penentuan pola komunitas bakteri dilakukan berdasarkan profil denaturasi gradien gel dan konstruksi pohon filogeni didasarkan atas urutan nukleotida gen 16S rRNA dari sampel bakteri. Sampel bakteri termofilik diekstraksi total DNA kromosomnya dan dipakai sebagai templat untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR secara parsial. Pola komunitas bakteri ditentukan dengan metode DGGE. Hasil amplifikasi lengkap akan difragmentasi pada gel DGGE berdasarkan perbedaan kandungan G-C pada masing-masing untai DNA yang menentukan kecepatan denaturasi dari fragmen-fragmen yang bersangkutan. Fragmen yang diperoleh di re-PCR dan ditentukan urutan nukleotidanya. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan cara dibandingkan dengan database *GenBank*. Hasil yang diharapkan adalah diperolehnya informasi mengenai komunitas dan pohon filogeni bakteri termofilik isolat lokal. Hasil tersebut diharapkan mampu memberikan sumbangan informasi yang cukup luas dalam bidang biodiversitas mikroba Indonesia serta membuka peluang bagi eksplorasi enzim-enzim termostabil berikutnya.

Konteks Penelitian

Enzim maupun protein termostabil banyak dieksplorasi dalam dasawarsa terakhir karena perannya yang sangat luas dan penting bagi pengembangan ilmu dasar maupun industri (Madigan *et al.*, 1997). Kenyataan ini memicu berbagai pihak untuk melakukan eksplorasi terhadap berbagai organisme penghasil enzim termostabil. Salah satu sumber potensial enzim tersebut adalah bakteri termofilik yang hidup di sumber air panas (Alves *et al.*, 2003). Eksplorasi terhadap bakteri termofilik secara umum dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri tersebut pada media sintetik. Namun pada kenyataannya masih cukup sulit menumbuhkan bakteri pada medium sintetik karena seringkali media yang diberikan tidak sesuai dengan komposisi medium alamiah pertumbuhannya. Kondisi ini dipicu oleh sangat terbatasnya informasi mengenai komunitas strain mikroba yang hidup pada sumber-sumber alam tersebut. Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan sumber air panas termasuk diantaranya sumber-sumber yang terdapat di wilayah Jawa Tengah, namun eksplorasi terhadap bakteri-bakteri termofilik maupun enzim termostabilnya masih sangat terbatas.

Metode analisis yang cepat dalam rangka mendapatkan informasi biodiversitas atau komunitas mikroba yang sangat kompleks merupakan tujuan penting ekologi mikroba (Dunbar *et al.*, 2000). Lebih jauh Dunbar menyampaikan bahwa keragaman komunitas dapat ditentukan dalam beberapa tahap analisis. Metode analisis yang paling efektif saat ini didasarkan atas profil fragmen dan urutan nukleotida dari gen pengkode sub unit ribosom 16S rRNA (melalui metode PCR dan kadangkala diikuti oleh metode pemotongan dengan enzim restriksi terhadap campuran fragmen hasil amplifikasi) dalam rangka mengidentifikasi perbedaan komposisi fragmen DNA dari komunitas tersebut. Pendekatan terbaru mampu menggambarkan perbedaan tidak hanya dalam komposisi komunitas namun juga mampu dalam kumpulan komunitas dengan mengukur jumlah dan *relative abundance* dari spesies *phylotypes*. Analisis langsung terhadap klon gen 16S rRNA telah banyak dilaporkan (Sekiguchi *et al.*, 2002; Rheims *et al.*, 1999; Fuchs *et al.*, 1996; Trevisanato *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1985). Amplifikasi terhadap gen-gen 16S rRNA bakteri mampu memberikan informasi yang sangat komprehensif, namun analisis langsung terhadap klon-klon gen 16S rRNA merupakan metode

yang mahal dan tidak efisien. Salah satu metode yang cukup efisien adalah dengan terlebih dahulu melakukan penentuan distribusi populasi bakteri kemudian analisis urutan nukleotida gen 16S rRNA, metode yang banyak dilaporkan adalah menggunakan PCR-DGGE yaitu amplifikasi sebagian gen 16S rRNA dan dilanjutkan dengan elektroforesis gel gradient dengan menambahkan denaturant (Lapara *et al*, 2000; Ferris *et al*, 1997; Ferris *et al*, 1996; Muyzer *et al*, 1993). Metode lain adalah amplifikasi gen lengkap 16S rRNA, dilanjutkan dengan kloning serta analisis fragmen restriksi terminal (T-RFLP / TRF) (Dunbar *et al*, 2000; Liu *et al*, 1997).

Pendekatan

Isolasi bakteri-bakteri termofilik dilakukan melalui metode filtrasi menggunakan membran dengan pori sangat kecil sehingga tidak mampu dilewati oleh bakteri. Dengan cara ini komunitas lengkap bakteri baik yang bersifat dominan maupun tidak dominan dari suatu sumber diharapkan terjebak di membran. Metode analisis komunitas bakteri yang dilakukan dalam penelitian ini adalah amplifikasi sebagian gen 16S rRNA dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction) yang dilanjutkan dengan metode DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Dimana komunitas bakteri dianalisis dengan terlebih dulu melakukan perbanyakan gen parsial 16S rRNA dari masing-masing spesies. Distribusi populasi bakteri akan dianalisis kemudian berdasarkan profil fragmentasi ampikon (hasil PCR) dengan metode DGGE serta penentuan urutan nukleotida masing-masing fragmen. Fokus dari penelitian tahun pertama ini adalah mendapatkan komunitas bakteri dalam jumlah cukup dan baik, dan mendapatkan ampikon gen 16S rRNA dari masing-masing komunitas bakteri.