

**BIDANG MIPA**

**HIBAH PEKERTI  
ANGKATAN II, TAHUN I**

**USUL PENELITIAN TAHUN II**

**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.**

**Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Diponegoro  
Semarang**

**DIREKTORAT PENELITIAN DAN PENGABDIAN PADA MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL**

**2004**

**Halaman Pengesahan Usul Penelitian  
Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi  
Tahun II**

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 II : 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)

Semarang, 5 November 2004



Mengesahkan Usul Penelitian Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi  
Dekan Fakultas SAINS FMIPA-UNDIP

Menyetujui  
Ketua TPM

Ketua TPP

Dr. Wahyu Setia Budi, M.S.  
NIP. 131 450 438

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

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



Mengesahkan Usul Penelitian Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi  
Ketua Lembaga Penelitian UNDIP

Prof. Dr. dr. I. Riwanto, Sp.Bd.  
NIP. 131 529 454

<b>UPT-PUSTAK-UNDIP</b>	
Nn. Daft:	192/14 /mipa/sej
Tgl.	21/3/05

Tujuan Pengesahan Laporan Penelitian  
Untuk Penelitian Bantuan Riset Penelitian

1. **Kategori** : Analisis Komunitas dan Patogen yang Berakumulasi Termofilik sumber Air Panas di Wilayah Irawan, Candi
2. **Kategori** :  
 Nama : Agustina L.N.A, SSI, MSc/ NIP. 131 690 330  
 Jabatan/ Golongan : Asisten Ahli/ IIIA  
 Laboratorium/ Jurusan : Laboratorium Biokimia/ Jurusan Kimia  
 Fakultas/ Universitas : FMIPA/ Universitas Diponegoro - Semarang  
 Rombongan : 1. Mukhammad Asy'ari, SSI, M.S.  
 2. Dra. Nies Susa M., MEd.
3. **Kategori** :  
 Nama : Akhmaloka, Dipl. Biotech, PhD/ NIP. 131 690 330  
 Laboratorium/ Jurusan : Laboratorium KBK Asam Nucleat dan Genetika Molekul / Departemen Kimia  
 Fakultas/ Universitas : FMIPA/ Institut Teknologi Bandung
4. **Biaya** :  
 Biaya Penelitian : Rp 68.000.000,00  
 Biaya dari Dikti : Rp 68.000.000,00
5. **Angka Mendiknas** : 7 (tujuh) balai
6. **Tempat Penelitian** : 1. Laboratorium KBK Asam Nucleat dan Genetika Molekul (TPM)  
 2. Laboratorium Biokimia (LPP)

Semarang, 5 November 2004

Mengesahkan  
Dekan Fakultas MIPA-UNDIP

Menyetujui  
Ketua TPM

Ketua LPP

Dr. Wahono, SSI, M.S.  
NIP. 131 659 438

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

Agustina L.N.A, SSI, MSc  
NIP. 131 690 330

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian (LPL)

## SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa, nama-nama berikut ini:

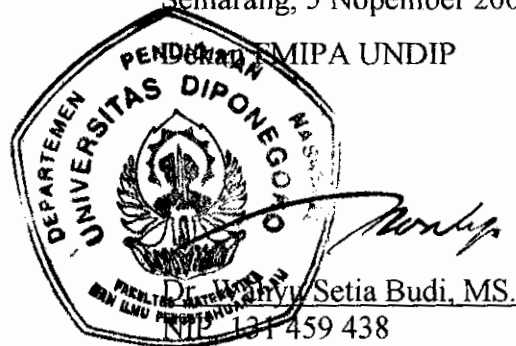
1. Agustina L. N. Aminin, M.Si.
2. Mukhammad Asy'ari, M.Si.
3. Dra. Nies Suci Mulyani, MS.

Staf dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Diponegoro

Bahwa yang bersangkutan tidak sedang mengikuti Pendidikan Pasca Sarjana

Demikianlah surat keterangan ini dibuat dengan sebenarnya, dan kepada pihak yang  
berwenang harap dimaklumi.

Semarang, 5 Nopember 2004



## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Akhmaloka, Ph D.  
Institusi : KBK Asam Nukleat dan Genetika Molekul  
Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung

bersedia untuk menjadi mitra dalam Proposal Penelitian Hibah Pekerti yang berjudul **“Analisis Komunitas dan Filogeni Bakteri-Bakteri Termofilik Sumber Air Panas di Wilayah Jawa Tengah”**, dengan Tim Peneliti Pengusul:

Ketua : Agustina Lulustyaningati Nurul Aminin, S.Si., M.Si.  
Anggota : 1. Mukhammad Asy'ari, S.Si., M.Si.  
2. Dra. Nies Suci Mulyani, MS.  
Institusi : Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Diponegoro Semarang

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya.

Bandung, 5 Nopember 2004

Akhmaloka, Ph D.  
Peneliti Mitra

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dra. Nies Suci Mulyani, MS.  
NIP : 131 597 639  
Alamat : Jl. Ketileng Asri V No 3 Semarang

Dengan ini menyatakan bersedia untuk melaksanakan program penelitian kerjasama antar perguruan tinggi dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Bersedia melaksanakan program penuh waktu sesuai dengan penjadwalan program dalam tahap perjanjian yang ditetapkan.
2. Bersedia tinggal di tempat perguruan tinggi mitra selama waktu yang ditetapkan dalam surat perjanjian.

Demikianlah surat perjanjian ini dibuat dengan sebenar-benarnya untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui,

Dekan FMIPA UNDIP



Anggota Peneliti Pengusul

Dra. Nies Suci Mulyani, MS.  
NIP. 131 597 639

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mukhammad Asy'ari, M.Si.  
NIP : 132 204 998  
Alamat : Jl. Mahesa Barat No 6 B Pedurungan Semarang

Dengan ini menyatakan bersedia untuk melaksanakan program penelitian kerjasama antar perguruan tinggi dengan ketentuan sebagai berikut:

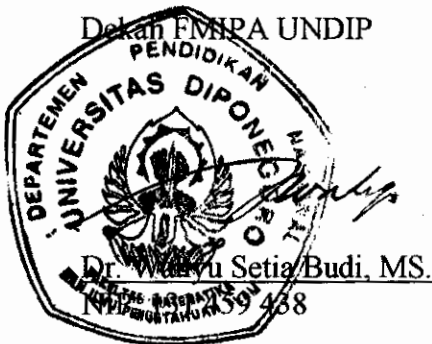
1. Bersedia melaksanakan program penuh waktu sesuai dengan penjadwalan program dalam tahap perjanjian yang ditetapkan.
2. Bersedia tinggal di tempat perguruan tinggi mitra selama waktu yang ditetapkan dalam surat perjanjian.

Demikianlah surat perjanjian ini dibuat dengan sebenar-benarnya untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui,

Dekan FMIPA UNDIP

Anggota Peneliti Pengusul



Mukhammad Asy'ari, M.Si.  
NIP. 132 204 998

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agustina Lulustyaningati Nurul Aminin, M.Si.

NIP : 132 231 662

Alamat : Jl Mulawarman Utara I / 31 Tembalang Semarang

Dengan ini menyatakan bersedia untuk melaksanakan program penelitian kerjasama antar perguruan tinggi dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Bersedia melaksanakan program penuh waktu sesuai dengan penjadwalan program dalam tahap perjanjian yang ditetapkan.
2. Bersedia tinggal di tempat perguruan tinggi mitra selama waktu yang ditetapkan dalam surat perjanjian.

Demikianlah surat perjanjian ini dibuat dengan sebenar-benarnya untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui,

Dekan FMIPA UNDIP



Ketua Peneliti Pengusul

Agustina L. N. A., M.Si.  
NIP. 132 231 662



## RINGKASAN

Penelitian Tahun II diusulkan dengan tujuan umum melanjutkan penelitian tahun I, yaitu memfragmentasi DNA hasil amplifikasi menggunakan metode DGGE. Jumlah fragmen terbentuk pada gel DGGE mewakili jumlah komunitas bakteri pada masing-masing sumber air panas. Jenis spesies bakteri ditentukan oleh hasil analisis urutan nukleotida dari tiap fragmen. Tujuan khususnya mendapatkan informasi jumlah dan jenis bakteri termofilik dari sumber-sumber air panas Jawa Tengah serta mendapatkan pohon filogeni masing-masing bakteri. Penelitian ini dilatar belakangi oleh kebutuhan dunia akan enzim-enzim alternatif yang mampu bekerja pada kondisi ekstrim, salah satunya adalah enzim termostabil yang mampu bekerja pada temperatur tinggi. 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. Keterbatasan ini pada umumnya disebabkan oleh kesulitan untuk mengkultivasi bakteri-bakteri dari lingkungan ekstrim di laboratorium. Dalam penelitian yang diusulkan ini hendak dilakukan analisis komunitas bakteri-bakteri termofilik dari sumber-sumber air panas di sekitar di Jawa Tengah. Informasi mengenai spesies-spesies bakteri yang menghuni suatu sumber merupakan informasi penting bagi ilmu biodiversitas dan lebih lanjut akan lebih memudahkan proses isolasi bakteri karena menggunakan media yang sesuai bagi spesies yang dituju.

Penentuan pola komunitas bakteri dilakukan berdasarkan profil denaturasi gradien gel dan kontruksi 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. Hasil amplifikasi lengkap akan diklon dan dianalisis dengan metode *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). Fragmen yang diperoleh pada pita gel hasil pemisahan dengan DGGE akan di Re-PCR dan ditentukan urutan DNA-nya dengan mesin sequenser. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dengan cara dibandingkan dengan database *GenBank*. Hasil yang diharapkan adalah diperolehnya informasi mengenai jumlah dan jenis komunitas bakteri termofilik isolat lokal. Informasi urutan gen 16S rRNA dari masing-

masing sampel akan dianalisis lebih lanjut terhadap data *GenBank* untuk penentuan spesies serta program DNA-Star untuk dibuat pohon filogeninya. Hasil tersebut diharapkan mampu memberikan sumbangan informasi yang cukup luas dalam bidang biodiversitas mikroba Indonesia serta membuka peluang bagi eksplorasi enzim-enzim termostabil berikutnya. Selain itu kegiatan penelitian kolaboratif TPP-TPM diharapkan dapat menghasilkan peningkatan kemampuan penelitian, khususnya di Laboratorium TPP. Hasil akhir yang juga diharapkan ialah meningkatnya percepatan riset nasional yang tinggi untuk memacu kegiatan penelitian ilmu-ilmu dasar dan lebih lanjut kepada arah produksi enzim berskala industri.

## URAIAN LENGKAP ATAS PENELITIAN YANG DIUSULKAN

### 1. 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 di laboratorium karena seringkali media yang diberikan tidak sesuai dengan kondisi media pertumbuhan bakteri atau komposisi medium alamiah pertumbuhannya. Situasi ini dipicu pula oleh sangat terbatasnya informasi mengenai komunitas strain bakteri 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. Agustina dkk. (2003) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim proteolitik dari bakteri termofilik sumber air panas Gedong Songo, Semarang. Demikian pula Nies dkk (2004) telah melaporkan hasil isolasinya terhadap enzim protease dari bakteri termofilik sumber air panas Plantungan-Kendal dan Gonoharjo-Boja. Isolasi terhadap enzim-enzim termostabil dari bakteri termofilik isolat lokal Jawa Tengah tersebut belum didukung oleh informasi mengenai strain bakteri yang bersangkutan. Metode konvensional penentuan spesies mikroba menggunakan reagen kimia dan analisis mikroskopik sudah dianggap usang karena sangat lama, mahal, dan kurang akurat. Kelompok peneliti termofilik pada KBK Asam Nukleat dan Genetika Molekul ITB telah cukup banyak melakukan eksplorasi terhadap bakteri-bakteri termofilik isolat lokal dari sumber sekitar Bandung. Kelompok ini telah melakukan isolasi dan karakterisasi terhadap enzim termostabil serta analisis terhadap gen 16S rRNA mikroba tersebut. Akhmaloka dkk (2000) telah melakukan studi biokimia dan biologi molekul terhadap enzim DNA polimerase

termotabil isolat lokal Cimanggu, isolat tersebut juga telah ditentukan strain-nya dengan metode analisis gen 16S rRNA.

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).