

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Bakteri Termofilik

Menurut Deacon (2003), berdasarkan temperatur pertumbuhannya, mikroorganisme dapat dikelompokkan kedalam tiga kelompok yaitu psikrofilik, mesofilik, dan termofilik. Psikrofilik merupakan mikroorganisme yang memiliki temperatur hidup maksimumnya 25 °C dan dapat tumbuh pada temperatur dingin bahkan pada -10 °C. Mesofilik adalah mikroorganisme yang hidup pada temperatur antara 25 °C sampai dengan 40 °C. Termofilik merupakan mikroorganisme yang dapat hidup pada temperatur tinggi (50 °C atau lebih) dengan temperatur pertumbuhan minimum sekitar 20 °C.

Bakteri termofilik dapat dibedakan dari makhluk hidup yang lain karena secara kimia membran selnya berbeda. Untuk mempertahankan diri pada temperatur yang tinggi, bakteri termofilik harus menjaga keutuhan membran plasmanya (Friedman, 1992). Membran sel termofilik mengandung lebih banyak asam lemak jenuh, rantai asam lemak lebih panjang dan bercabang. Dinding sel termofilik tersusun atas struktur “*S-layer*”. Sedangkan membran sel yang biasa ditemukan pada organisme mesofilik pada umumnya, mengandung asam lemak tak jenuh dan rantai tak bercabang. Selain itu, protein bakteri termofilik lebih tahan terhadap panas yang disebabkan oleh meruahnya rantai samping asam amino, interaksi ionik antara daerah asam dan basa rantai samping serta daerah hidrofobik yang meningkat (Atlas *et al.*, 1993; Brock, 1979; Johnson, 2003).

Atlas *et al.*, (1993) juga menyebutkan bahwa bakteri termofilik mempunyai komposisi DNA yang berbeda dari organisme yang lain. DNA bakteri termofilik mempunyai kadar guanin dan sitosin yang lebih tinggi daripada organisme yang lain.

## 2.2 Enzim Termostabil

Enzim termostabil adalah enzim yang mempunyai aktivitas maksimum pada temperatur tinggi yaitu di atas 60 °C (Bruins *et al.*, 2001). Enzim yang dihasilkan dari organisme termofilik dapat dioptimasi pada kondisi yang hampir sama dengan kondisi habitat organismenya (van den Burg, 2003).

Enzim-enzim yang dihasilkan dari organisme termofilik tidak hanya mengkatalisis reaksi pada temperatur tinggi, akan tetapi enzim termofilik lebih stabil daripada enzim-enzim yang dihasilkan oleh organisme mesofilik (Friedman, 1992). Kestabilan enzim ini dipengaruhi oleh kekakuan (*rigidity*) struktur, hidrofobisitas enzim, dan peningkatan muatan permukaan (van den Burg, 2003; Bruins *et al.*, 2001).

Enzim termostabil telah digunakan antara lain untuk bahan aditif pada deterjen, pembuatan pemanis alami dan pembuatan obat-obatan. Beberapa contoh adalah, enzim xilosa isomerase yang dihasilkan oleh *B. coagulans*, yang berperan pada produksi gula jagung kadar fruktosa tinggi pada temperatur 60 °C,  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus licheniformis*, menghidrolisis pati pada temperatur 95 °C – 110 °C dan protease termostabil yang biasa digunakan dalam deterjen (Friedman, 1992).

## 2.3 Karakteristik Bakteri

Bakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan morfologi dan komposisi dinding selnya (Wood dan Smith, 1993).

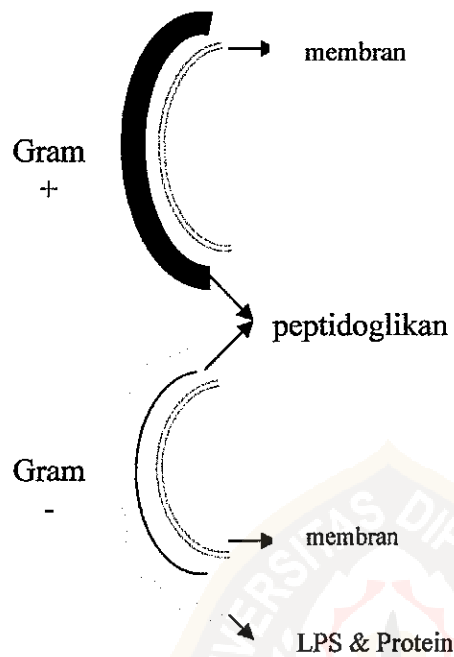
### Morfologi bakteri

Terdapat tiga bentuk morfologi utama bakteri yaitu, bola (*coccus*), batang lurus (*basilus*) dan batang berkelok atau spiral (*Vibrio, Campylobacter*). Diameter rata-rata bola (*coccus*) biasanya 1  $\mu\text{m}$ , batang mempunyai panjang 2-5  $\mu\text{m}$  dan lebar sekitar 0,5-1  $\mu\text{m}$  dan spiral mempunyai lebar sekitar 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  dan panjang rata-rata 5-20  $\mu\text{m}$  (Carman, 2001).

### Komposisi Dinding Sel Bakteri

Berdasarkan komposisi dinding selnya, bakteri dibedakan kedalam dua kelas yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Terdapat perbedaan komposisi dinding sel antara dua kelas Gram bakteri. Bakteri gram negatif mempunyai struktur dinding sel multilayer, mengandung 5-20 % peptidoglikan, dinding sel mengandung lipid, polisakarida dan protein, biasa ada pada membran di luar membran peptidoglikan. Membran luar mengandung lipopolisakarida (LPS). Bakteri gram positif mempunyai dinding sel lapis tunggal dan lebih kuat. Lapisan yang rapat dihasilkan oleh lapisan peptidoglikan yang mempunyai ikatan silang peptida (*cross-link*) yang dibentuk oleh asam amino. Dinding sel mengandung 90 % peptidoglikan dan mengandung *teichoic acid* tetapi tidak mengandung

lipopolisakarida. Perbedaan ini ditunjukkan oleh gambar 2.1 (Brock, 1979; Carman, 2001).



Gambar 2.1. Dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif

Jenis gram bakteri dapat diidentifikasi dengan uji pewarnaan gram (Gram's Stain). Bakteri gram positif akan menghasilkan warna ungu, sedangkan bakteri gram negatif akan memberikan warna merah pada akhir reaksi pewarnaan (Carman, 2001).

#### 2.4 Isolasi Bakteri

Bakteri dapat diisolasi dari habitatnya. Isolasi dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media cair yang sesuai dilanjutkan dengan menumbuhkan

bakteri pada media padat. Media padat yang biasa digunakan adalah media agar (Brock, 1979).

Isolasi bakteri pada media padat agar yang dilakukan untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk koloni-koloni dilakukan dengan metode *spread*. Metode ini dilakukan dengan meratakan kultur bakteri diatas media agar kemudian dilakukan inkubasi sampai terbentuk koloni bakteri yang dapat dilihat mata. Sedangkan untuk memperoleh koloni tunggal bakteri dilakukan metode *streak*, yaitu menumbuhkan bakteri dengan membuat goresan di atas media agar sehingga bakteri akan tumbuh mengikuti jalur yang dibuat tersebut (Brock, 1979).

## 2.5 Filogenetik Molekul Mikroorganismen

Metode molekuler telah digunakan untuk menentukan filogenetik mikroorganismen, baik dalam bidang ekologi mikroba maupun diagnosis klinik. Bahkan metode molekuler mampu mengukur jarak evolusi antara dua organismen berdasarkan homologi urutan nukleotidanya. Metode molekuler yang biasa digunakan untuk identifikasi filogeni adalah analisis urutan nukleotida gen ribosomnya (Withfield, 2004).

Ribosom merupakan tempat sintesis protein, yang merupakan partikel ribonukleoprotein yang mengandung lebih banyak RNA daripada protein. Ribosom RNA terdiri dari tiga molekul, pada prokariot mempunyai ukuran 5S, 16S, dan 23S (S: Svedberg). Ribosom terbagi ke dalam dua subunit yaitu subunit besar dan subunit kecil. Subunit besar (50S; ~1500 kDa) terdiri atas 23S rRNA (~2900 nukleotida), 5S rRNA (~ 120 nukleotida) dan 31 protein. Subunit kecil

(30S; ~900 kDa) terdiri atas 16S rRNA (~1500 nukleotida) dan 21 protein. Ribosom akan aktif jika kompleks subunit besar dan subunit kecil bersatu. Bentuk dasar ribosom adalah *conserved* (lestari), akan tetapi terdapat variasi pada ukuran keseluruhan protein dan proporsi RNA. Ribosom RNA menempati komposisi utama massa ribosom bakteri (Lewin, 1998; Armstrong, 1995).

Gen 16S rRNA dan 23S rRNA merupakan daerah yang *conserved*/lestari dan berfungsi sebagai penanda filogenetik. Oleh karena 16S rRNA lebih mudah penanganannya dalam eksperimen maka gen ini lebih banyak digunakan untuk menentukan filogenetik prokariot (Lewin, 1998; Armstrong, 1995; Withfield, 2004). Gen 16S rRNA ini *conserved* disebabkan oleh fungsinya yang merupakan tempat menempelnya mRNA pada proses translasi sintesis protein (Armstrong, 1995; Luo *et al.*, 2003; Ussery *et al.*, 2004).

## 2.6 Reaksi Polimerisasi Berantai (PCR)

Reaksi Polimerisasi Berantai (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) merupakan metode penggandaan fragmen DNA dari suatu templat DNA secara *in vitro*. Reaksi ini disebut reaksi berantai karena untai DNA baru yang terbentuk berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis DNA pada siklus berikutnya.

Pada reaksi ini dibutuhkan antara lain DNA target yang akan digandakan, sepasang oligonukleotida (primer) yang digunakan untuk membatasi ukuran DNA target yang akan digandakan, monomer-monomer DNA (dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP) dan enzim DNA polimerase (Sambrook dan Russel, 2001; Innis *et al.*, 1990).

Primer merupakan oligonukleotida pendek yang mengandung 15–20 pasang basa. Pasangan primer akan menempel pada bagian ujung-ujung DNA target, sehingga berfungsi sebagai pembatas ukuran DNA target yang akan digandakan (Innis *et al.*, 1990). Reaksi PCR berlangsung pada temperatur tinggi sehingga dibutuhkan enzim-enzim termostabil. Enzim termostabil yang biasa digunakan dalam reaksi polimerisasi DNA adalah *Taq* DNA polimerase (Sambrook dan Russel, 2001). Enzim DNA polimerase juga bekerja pada kondisi pH optimumnya sehingga diperlukan larutan bufer yang berfungsi menjaga pH larutan reaksinya (Strachan dan Andrew, 1999).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan metode umum yang sudah cukup banyak digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA. Klijn *et al.*, (1995) dan Paillard *et al.*, (2003), telah berhasil mengamplifikasi fragmen 16S rRNA dan mengidentifikasi urutan nukleotidanya untuk mengidentifikasi jenis bakteri asam laktat mesofil.

Pada prakteknya, metode PCR terdiri atas tiga tahapan reaksi yaitu denaturasi, hibridisasi/*annealing* dan polimerisasi.

### Denaturasi

Denaturasi merupakan proses awal yang bertujuan untuk membuka untai ganda DNA menjadi DNA untai tunggal melalui pemutusan ikatan hidrogen antar basa-basanya pada suhu tinggi, yaitu sekitar 95 °C.

### Hibridisasi/Annealing

Pada tahap ini primer mulai menempel pada templat DNA. Temperatur yang digunakan pada tahap *annealing* ( $T_{An}$ ) tergantung pada temperatur pelelehannya (*melting temperatur*,  $T_m$ ) yaitu temperatur 50% DNA dalam keadaan terdenaturasi. Besarnya nilai  $T_m$  dipengaruhi oleh komposisi basa-basa penyusun DNA seperti ditunjukkan oleh persamaan (1) dan (2).

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) \quad (1)$$

$$T_{An} = \pm (T_m - 5) \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2)$$

### Polimerisasi

Polimerisasi merupakan tahapan enzim DNA polimerase mulai mensintesis DNA baru. Temperatur yang biasa digunakan adalah  $\pm 72 \text{ } ^\circ\text{C}$ , temperatur ini merupakan temperatur optimum dari aktivitas enzim DNA polimerase (Strachan dan Andrew, 1999; Brown, 1995; Innis *et al.*, 1990).

Reaksi pada PCR dimulai dengan membukanya untai ganda DNA membentuk DNA untai tunggal. Setelah primer ditambahkan, primer akan berikatan secara spesifik dengan urutan DNA yang komplemen pada daerah target. Dengan keberadaan DNA polimerase yang memperpanjang untai dan monomer DNA (dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP) akan menginisiasi sintesis DNA baru yang komplemen dengan templat DNA dan akan tumpang tindih satu sama lain (Stachan dan Andrew, 1999; Innis *et al.*, 1990).

Secara teoritis jumlah DNA yang dihasilkan selama proses PCR sebanyak  $2^n$  dengan  $n$  adalah jumlah siklus. Sehingga apabila reaksi PCR berlangsung



selama 30 siklus maka jumlah DNA yang dihasilkan sekitar  $2^{30}$  untai DNA. Metode PCR merupakan metode penggandaan DNA yang efektif dan efisien.

## 2.7 Elektroforesis Gel Agarosa

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul berdasarkan muatan elektrik molekulnya. Jika elektroforesis dilakukan didalam suatu matrik gel maka molekul yang mempunyai muatan sama akan terpisah berdasarkan ukuran molekulnya. Jika molekul DNA diletakkan dalam suatu daerah bermuatan listrik dalam matrik gel maka molekul DNA akan bermigrasi ke kutub positif dan terpisah berdasarkan ukuran molekulnya (Brown, 1995).

Elektroforesis dapat dilakukan menggunakan gel agarosa dan gel poliakrilamid. Pori gel agarosa lebih besar daripada pori gel poliakrilamid, sehingga agarosa mempunyai rentangan pemisahan yang lebar. Gel poliakrilamid efektif digunakan untuk memisahkan fragmen yang kecil yaitu sekitar 5-500 pasang basa. Fragmen DNA 50-20000 pasang basa paling baik dipisahkan dengan gel agarosa (Sambrook dan Russel, 2001).

Faktor-faktor yang mempengaruhi migrasi DNA pada gel agarosa, antara lain: Ukuran molekul DNA, molekul yang lebih besar bermigrasi lebih lambat daripada molekul yang lebih kecil. Konsentrasi agarosa, mobilitas DNA dalam gel tergantung pada ukuran pori yang dipengaruhi oleh konsentrasi agarosa. Konformasi DNA yang berbeda (superhelik sirkular, lembaran sirkular dan linear) mempunyai kecepatan migrasi yang berbeda pula. *Loading buffer* akan meningkatkan kerapatan sampel, mewarnai sampel dan mempermudah pengamatan saat elektro-

foresis. Etidium Bromida berfungsi sebagai pewarna fluoresensi untuk DNA sehingga mempermudah dalam pengamatan migrasi DNA dalam gel agarosa. Tegangan yang digunakan pada saat elektroforesis sebaiknya pada tegangan rendah karena pada tegangan rendah kecepatan migrasi fragmen DNA linear sebanding dengan tegangannya. Jika tegangan dinaikkan, dapat menyebabkan DNA terdenaturasi dan pelelehan gel. Bufer elektroforesis, dianjurkan menggunakan bufer elektroforesis tanpa adanya ion, sehingga konduktivitas listriknya rendah maka mobilitas DNA lambat (Sambrook dan Russell., 2001)

## 2.8 Sekuensing

Metode sekuensing DNA digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida DNA/RNA. Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode enzimatik yang ditemukan oleh Sanger dkk., dan metode degradasi kimia yang ditemukan oleh Maxam dan Gilbert (Sambrook dan Russell, 2001)

Metode enzimatik lebih dikenal sebagai Metode Dideoksi Sanger karena dalam metode sekuensing ini menggunakan monomer dideoksi (ddNTP) sebagai mediator terminasinya. Reaksi sekuensing membutuhkan sebuah primer yang akan menempel pada untai tunggal templat DNA. Reaksi sekuensing terjadi melalui reaksi polimerisasi monomer dNTP oleh DNA polimerase dan diterminasi oleh ddNTP (dNTP yang kehilangan atom oksigen pada ujung 3'). Pada saat ddNTP bergabung dalam sintesis untai DNA, dengan tidak adanya gugus hidroksil -OH pada ujung 3' menyebabkan ikatan fosfodiester dengan dNTP selanjut-

nya tidak terbentuk sehingga tidak terjadi reaksi pemanjangan rantai selanjutnya (Sambrook dan Russell, 2001; Watson *et al.*, 1998)

Untuk membantu pengamatan digunakan indikator warna fluoresensi yang dilakukan dengan cara melabel ddNTP dengan zat fluoresensi non radioaktif. Populasi oligonukleotida hasil sekuensing dideteksi dengan elektroforesis poliakrilamid menggunakan detektor otomatis dengan program komputer sehingga dihasilkan urutan nukleotidanya (Sambrook dan Russel, 2001; Watson *et al.*, 1998). Hasil urutan nukleotida dibandingkan dengan urutan nukleotida dari bankdata dengan metode BLAST, sehingga diperoleh kemiripan genotipiknya.

## 2.9 Enzim Ekstraseluler

Enzim ekstraseluler adalah enzim yang disekresikan oleh mikroorganisme pada media pertumbuhannya. Beberapa enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh organisme termofilik menurut Maheshwari *et al.*, (2000), diantaranya adalah protease, amilase dan  $\beta$ -galaktosidase.

### Protease

Protease dapat dikelompokkan dalam beberapa kelas berdasarkan pada asam amino kritis yang dibutuhkan pada sisi katalitiknya (contoh Serin Protease), pH optimum untuk aktivitasnya (protease asam, netral dan basa), sisi-sisi pembe-lahan (contoh amino peptidase yang bereaksi pada terminal N bebas dari rantai polipeptida, atau karboksipeptidase yang bereaksi pada terminal C cincin polipeptida) dan adanya gugus thiol bebas (Thiol protease).

Protease telah lama digunakan dalam industri makanan, hasil ternak, deterjen dan untuk pemrosesan kulit. Kebutuhan akan protease termotabil ini menyebabkan pentingnya eksplorasi terhadap organisme-organisme penghasil enzim ini (Maheshwari *et al.*, 2000).

Protease dapat diidentifikasi dengan menggunakan media gelatin. Gelatin merupakan protein murni yang rentan terhadap protease. Identifikasi dengan menggunakan gelatin dilakukan dengan menambahkan protease kedalam media nutrien gelatin. Media kemudian disimpan dalam almari es selama 10 menit. Gelatin akan memadat apabila didinginkan, karena gelatin telah dihidrolisis oleh protease maka proses pendinginan tidak bisa memadatkan gelatin. Apabila gelatin tetap cair berarti terjadi hidrolisis protein oleh protease sedangkan jika gelatin memadat berarti tidak terjadi hidrolisis oleh protease (Cowan dan Steels, 1974).

### Beta Galaktosidase

Laktase atau  $\beta$ -galaktosidase merupakan enzim yang menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Laktase dapat diekstraksi dari jamur seperti *Kluyveromyces fragilis* dan bakteri (Bhowmik dan Marth, 1989).

Bakteri menghasilkan  $\beta$ -galaktosidase pada saat bakteri tumbuh pada media yang mengandung laktosa (Herskowitz, 1996). Keberadaan  $\beta$ -galaktosidase dapat diidentifikasi dengan substrat ONPG (o-nitrofenil-D-glukopiranosida), karena  $\beta$ -galaktosidase dapat menghidrolisis ONPG menjadi ONP (o-nitrofenil) yang berwarna kuning (Sambrook dan Russel, 2001).

## Amilase

Amilase tergolong enzim sakaridase, yaitu enzim yang menghidrolisis polisakarida. Amilase mengkatalisis hidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida polisakarida menjadi dekstrin, oligosakarida, maltosa dan D-glukosa. Amilase dihasilkan oleh hewan, tanaman, jamur dan bakteri (Bruins, 2001). Enzim ini dikelompokkan lagi berdasarkan ikatan glikosida yang diputusnya. Alpha-amilase menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4-glikosida, secara acak menghasilkan dekstrin, maltotriosa, maltosa dan glukosa (Wang, 2004).

Amilase banyak digunakan dalam berbagai industri. Pada industri fermentasi, amilase digunakan untuk mengubah pati menjadi gula fermentasi, industri tekstil untuk *designing*, industri kertas untuk *sizing* dan industri makanan untuk membuat sirup manis (Friedman, 1992; van den Burg, 2003).

Identifikasi  $\alpha$ -amilase dilakukan dengan menginduksi bakteri pada media yang mengandung amilum dan pengujian menggunakan larutan iodin. penambahan larutan iodin pada kultur bakteri akan menghasilkan warna kuning apabila bakteri menghasilkan  $\alpha$ -amilase (Brock, 1979).