

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik termasuk mikroorganisme ekstremofil, yaitu mikroorganisme yang dapat bertahan hidup dalam kondisi ekstrim, seperti suhu tinggi (termofil), suhu rendah (psikrofil), pH rendah (asidofil), pH tinggi (alkalifil), tekanan tinggi (barofil), dan kadar garam tinggi (halofil) (Maloney, 2002). Bakteri termofilik merupakan sel unik yang mampu tumbuh pada suhu tinggi. Meski batas tertinggi suhu untuk hidup belum dapat dipastikan, *archaebacteria* termofil dapat hidup pada suhu 110 °C di dasar laut. Termofilik dapat ditemukan dari golongan *algae*, *fungi*, *protozoa*, *cyanobacteria*, *eubacteria*, dan *archaebacteria* (Friedman, 1992). Organisme ini dapat ditemukan di mata air panas, kawah gunung berapi, dan palung laut dalam serta gunung api bawah laut (Maloney, 2002). Setiap jenis bakteri termofilik mempunyai suhu pertumbuhan maksimum yang berbeda-beda.

Bakteri termofilik dapat diklasifikasikan dalam tiga kelompok berdasar suhu pertumbuhannya. Termofilik fakultatif mempunyai suhu maksimum 50-65 °C dan juga dapat tumbuh pada suhu di bawah 30 °C. Obligat termofilik tidak akan tumbuh di bawah suhu 40-42 °C dan mempunyai suhu pertumbuhan maksimum 50-70 °C. Termofilik ekstrim mempunyai suhu maksimum lebih dari 70 °C dan suhu optimum lebih dari 65 °C, serta suhu minimum lebih dari 40 °C.

Bakteri termofilik mempunyai kontribusi yang sangat penting untuk ilmu pengetahuan, industri, dan medis karena sifatnya yang tahan terhadap suhu tinggi, dapat menghasilkan enzim termostabil, mengurangi resiko kontaminasi, serta dapat meningkatkan kecepatan reaksi (Andre, 1992). Organisme ini mempunyai enzim yang dapat mengkatalisis reaksi biokimia tertentu pada kondisi ekstrim, seperti protease pada industri deterjen, amilase pada industri pembuatan kue dan bir (Madigan dan Mars, 1997). Organisme ini mempunyai komponen seluler seperti protein, asam nukleat, dan lipid yang stabil pada temperatur tinggi (Bruins, *et al.*, 2001).

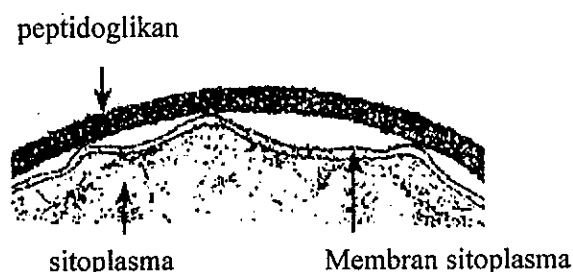
Bakteri termofilik dapat hidup pada suhu tinggi karena komponen selulernya mampu beradaptasi pada suhu tinggi. Adaptasi terhadap suhu tinggi ini dapat berupa aklimatisasi atau termotoleran (Moseley, 1997). Bakteri termofilik memberi respon terhadap kenaikan suhu dengan cara mensintesis protein yang disebut *heat shock protein* (HSPs) (Vanbogelen dan Neidhardt, 1990). HSPs adalah mekanisme respon terhadap kenaikan suhu yang dapat ditemukan pada beberapa organisme (Narberhaus, 2002). HSPs akan melindungi protein dari denaturasi pada suhu tinggi (Trent *et al.*, 1994, Takai *et al.*, 1998)

2.2. Mikrobiologi Konvensional

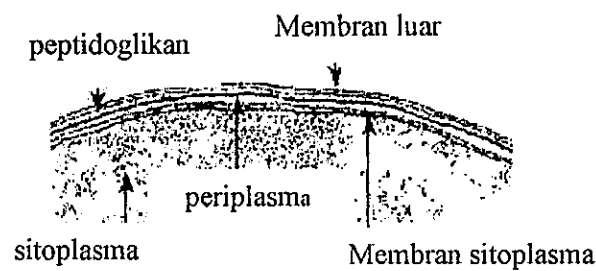
Identifikasi jenis-jenis bakteri secara mikrobiologi konvensional dapat dilakukan dengan menggunakan media selektif yang mampu membedakan antara jenis bakteri satu dengan yang lain. Media selektif tersebut merupakan media sintetik yang didesain khusus untuk jenis mikroorganisme tertentu sehingga

mikroorganisme yang tidak cocok dengan media akan memberikan reaksi yang berbeda. Akan tetapi cara identifikasi ini memiliki kekurangan dengan adanya keterbatasan media pengkulturan (Wise *et al.*, 1997). Selain itu, identifikasi jenis-jenis bakteri juga dapat dilakukan dengan metode fenotipik, yaitu melalui uji morfologi dan biokimia (Matzinger, 2004). Identifikasi dengan metode fenotipik memiliki kelemahan, yaitu tidak bisa digunakan pada bakteri tertentu, seperti bakteri patogen serta belum bisa mengidentifikasi sebagian besar jenis mikroorganisme yang ada.

Pengelompokan mikroorganisme dapat dilakukan dengan teknik pewarnaan gram yang didasarkan pada kemampuan dinding sel untuk mempertahankan warna di dalam matriknya (Saida *et al.*, 1998). Metode pewarnaan gram membagi bakteri menjadi dua kelompok, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif, berdasarkan komposisi dinding selnya (Johnson, *et al.*, 1995). Dinding sel pada bakteri gram positif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri gram negatif memiliki membran luar dan lapisan peptidoglikan yang lebih tipis (Beveridge, 1999). Perbedaan dinding sel bakteri gram negatif dengan bakteri gram positif dapat dilihat pada gambar 2.1 dan gambar 2.2 (Smith dan Wood, 1992).



Gambar 2.1. Dinding sel bakteri gram positif



Gambar 2.2: Dinding sel bakteri gram negatif

Pada pewarnaan gram dapat diketahui bahwa bakteri gram positif berwarna ungu gelap sampai hitam, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah menyala (Carman, 2001) atau merah muda (Bartholomew *et al.*, 1965)

2.3. Identifikasi Gen 16S rRNA

Ribosomal RNA (rRNA) merupakan molekul yang terdapat pada semua organisme. Suatu tipe rRNA, yaitu 16S rRNA, mempunyai daerah nukleotida atau urutan pengenalan, yang bersifat unik pada tiap-tiap bakteri. Ribosomal RNA merupakan molekul kuno yang bersifat konstan secara fungsional, terdistribusi secara universal, dan bersifat lestari (*conserved*) selama evolusi (Coskuner, 2002). Gen 16S rRNA pada bakteri mempunyai daerah pengenalan yang urutannya bersifat lestari (*conserved*) dan berguna untuk mengetahui tingkat kekerabatan organisme. Tingkat kesamaan urutan nukleotida pada rRNA mengindikasikan hubungan kekerabatan antar organisme. Urutan nukleotida pada gen 16S rRNA diturunkan dari generasi ke generasi dengan urutan yang tetap (Alimang *et al.*, 1994). Stabilitas molekul ini merupakan dasar dari aplikasinya

untuk mengidentifikasi organisme pada tingkat *family* dan yang lebih tinggi (Roble *et al.*, 2001).

Identifikasi gen 16S rRNA merupakan metode alternatif ketika metode konvensional gagal (Gorkiewicz *et al.*, 2003). Selain itu, identifikasi gen 16S rRNA juga dapat digunakan untuk menentukan filogeni bakteri dan untuk mengidentifikasi bakteri yang belum diketahui jenisnya (Roble *et al.* 2001).

Untuk mengetahui jenis dan sifat bakteri dilakukan dengan membandingkan urutan gen 16S rRNA pada organisme yang akan diidentifikasi dibandingkan dengan urutan gen 16S rRNA yang telah diketahui (Schmidt *et al.*, 1991). Selain itu, identifikasi molekuler gen 16S rRNA juga dapat digunakan untuk mengetahui diversitas dan komposisi komunitas mikrobial di suatu lingkungan (Ellor *et al.*, 2004).

2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR, yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983 merupakan penemuan yang penting dalam biologi molekuler. PCR adalah reaksi polimerisasi polinukleotida secara berantai yang merupakan prosedur efektif untuk memperbanyak DNA secara *in vitro*. Sekarang teknik PCR telah digunakan secara luas untuk berbagai aplikasi (Griffin dan Griffin, 1994).

PCR dapat mengamplifikasi suatu fragmen tertentu dari DNA atau RNA. Molekul DNA dapat dipilih untuk diamplifikasi di daerah manapun. Untuk melakukan PCR, dua oligonukleotida pendek harus dihibridisasikan ke molekul DNA, satu ke masing-masing untai ganda dan berperan sebagai primer. Selain

itu, proses ini juga memerlukan DNA polimerase untuk mensintesis DNA, dNTP sebagai bahan dasar, DNA target, dan bufer untuk mengoptimalkan aktivitas enzim yang digunakan (Brown, 1995).

PCR sangat sensitif, sehingga satu molekul DNA dapat diamplifikasi. Gen yang telah diperbanyak dapat dilihat sebagai pita-pita yang terpisah pada gel agarosa. PCR juga dapat digunakan untuk skrining cepat atau sekuensing secara langsung dari koloni bakteri (Innis *et al.*, 1990).

Proses PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu tahap denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50 °C selama 1 menit dan tahap *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit (Cheung *et al.*, 2004). PCR dilakukan sebanyak 25-30 siklus dalam *termosikler* (Alam *et al.*, 2002). Untuk tiap siklus PCR meliputi tahapan denaturasi oleh pemanasan, *annealing* primer dan *extension* oleh DNA polimerase termostabil.

a. Denaturasi

Denaturasi rantai DNA untai ganda tergantung pada jumlah basa C+G yang ada. Jika basa C+G dalam perbandingan jumlah yang besar (>55%) dan ukuran molekul DNANYA relatif lebih panjang, maka diperlukan temperatur yang lebih tinggi untuk memisahkan untai ganda menjadi untai tunggal secara sempurna. Oleh karena itu, jika temperatur denaturasinya lebih rendah maka molekul DNA tersebut akan tetap dalam konformasi alaminya. Pada PCR yang dikatalisis oleh *Taq* DNA polimerase, tahap denaturasi dilakukan pada suhu 94-95 °C yang juga merupakan suhu pengaktifan *Taq* DNA polimerase (Sambrook dan Russel, 2001).

b. *Annealing*

Proses *annealing* terjadi pada temperatur yang bersifat kritis. Jika *annealing* terjadi pada temperatur yang terlalu tinggi maka DNA yang teramplifikasi sangat sedikit, tetapi jika terjadi pada temperatur yang terlalu rendah maka dimungkinkan akan terjadi amplifikasi pada fragmen yang tidak diinginkan. Kondisi *annealing* yang paling optimal terjadi pada temperatur sekitar 2 °C hingga 10 °C dibawah *melting temperature* (T_m) dua primer. *Melting temperature* adalah suhu dimana untai DNA terdenaturasi sebanyak 50 % . T_m dapat dihitung dengan persamaan berikut:

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

Dimana : T_m = *melting temperature*

(A + T) = jumlah A dan T dalam oligonukleotida

(G + C) = jumlah G dan C dalam oligonukleotida

(Sambrook dan Russel, 2001).

c. *Extension* (pemanjangan) primer

Proses pemanjangan primer terjadi di dekat temperatur optimal DNA polimerase termotabil yang digunakan. *Taq* DNA polimerase optimum bekerja pada temperatur 72-78 °C. Enzim ini mampu mengkatalisis polimerisasi dengan kecepatan sekitar 2000 nukleotida per menit (Sambrook dan Russel, 2001).

Analisis produk PCR dalam gel agarosa dapat digunakan untuk menentukan ukuran DNA secara langsung. Produk ini juga dapat dimurnikan dan disekuensing dari gel, tanpa harus menghasilkan templat untai tunggal dari galur bakteri (Griffin dan Griffin, 1994). PCR juga dapat digunakan untuk menentukan

konsentrasi DNA target relatif terhadap DNA standar (Sambrook dan Russel, 2001).

2.5. Sekuensing

Sekuensing merupakan metode untuk menentukan urutan nukleotida dari DNA atau RNA. Salah satu aplikasi sekuensing adalah untuk mengetahui mutasi pada suatu gen tertentu. Proses sekuensing memerlukan satu primer, dNTP, enzim DNA polimerase, ddNTP yang dilabeli dengan warna fluoresen tertentu dan elektroforesis (Sambrook dan Russel, 2001).

Berdasarkan reaksinya sekuensing dibedakan menjadi dua (Kaetzke dan Eschrich, 2002), yaitu:

1. Metode Sanger (metode sekuensing enzimatik)

Metode ini berlangsung dalam dua tahap, yaitu reaksi sintesis untuk menghasilkan fragmen DNA sesuai templat menggunakan monomer dNTP dan reaksi terminasi labeling, yaitu masuknya ddNTP ke dalam fragmen DNA hasil sintesis yang berfungsi menghentikan (terminasi) proses sintesis dan sekaligus memberi warna (labeling) pada nukleotida.

2. Metode Maxam-Gilbert (metode sekuensing kimiawi)

Metode ini berdasarkan reaksi kimia spesifik yang terjadi pada bagian akhir molekul DNA yang telah diberi tanda (*probe*). Untuk memperoleh *probe* ini, suatu molekul DNA *double stranded* ditandai dengan fosfor radioaktif hanya pada ujung 5 dari masing-masing untai dengan bantuan enzim tertentu, yaitu polinukleotidkinase (Sambrook dan Russel, 2001).

2.6. Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu metode yang sering digunakan dalam biologi molekul untuk memisahkan, mengidentifikasi dan memurnikan fragmen DNA atau protein. Metode ini mempunyai prinsip pemisahan DNA atau protein berdasarkan sifat muatan listriknya. Teknik ini sederhana, cepat pelaksanaannya, dan bisa memisahkan fragmen DNA yang tidak dapat dipisahkan dengan metode lainnya. Elektroforesis ada dua macam, yaitu :

1. Elektroforesis vertikal

Menggunakan gel poliakrilamida (PAA) dan dalam posisi gel vertikal, digunakan untuk protein dan fragmen DNA yang kecil (5-500 pasang basa).

2. Elektroforesis horizontal

Menggunakan gel agarosa dan dalam posisi gel horizontal, digunakan untuk DNA. Untuk gel agarosa, lokasi DNA dapat langsung ditentukan dari pita-pita yang muncul setelah proses selesai dan dapat dilihat dengan menggunakan bantuan sinar UV.

Pemilihan agarosa atau PAA berdasarkan ukuran fragmen yang akan dipisahkan. Gel PAA lebih efektif untuk memisahkan protein atau fragmen DNA yang kecil (5-500 pasang basa). PAA lebih sulit untuk dipersiapkan dan ditangani daripada agarosa. Gel agarosa mempunyai *range* pemisahan yang lebih luas (Sambrook dan Russel, 2001)

2.7. Enzim Termostabil

Sekarang banyak penelitian tentang bakteri termofilik dan enzim yang dihasilkannya. Secara umum, enzim yang diekstraksi dari bakteri termofilik bersifat termostabil, tahan terhadap denaturasi karena suhu tinggi dan pelarut organik (Parvaresh *et al.*, 1990).

Enzim termostabil mempunyai beberapa keuntungan, antara lain reaktivitas tinggi, stabilitas tinggi, sedikit kontaminan dan resisten terhadap pendenaturan protein, pelarut organik serta detergen (Parvaresh *et al.*, 1990). Enzim termostabil dapat diperoleh dari organisme termofilik, seperti bakteri termofilik, dan psikrofilik (Andres, 1999). Beberapa enzim mempunyai aplikasi di industri sebagai aditif deterjen (protease, lipase), serta *Taq* polimerase untuk identifikasi genetik dan PCR (Bruins, *et al.*, 2001).

Enzim termostabil digunakan pada proses industri menggantikan enzim mesofil. Reaksi enzimatik pada suhu tinggi memiliki beberapa keuntungan, yaitu kontaminan mikrobial dapat dikurangi, viskositas rendah, dan kecepatan transfer meningkat (Bruins *et al.*, 2001). Enzim-enzim termostabil yang banyak digunakan pada bidang industri antara lain: protease, amilase, dan β -Galaktosidase.

2.7.1 Protease

Protease termostabil merupakan salah satu enzim yang dapat diekstraksi dari bakteri termofilik. Protease merupakan kelompok yang penting dalam industri yang menggunakan enzim, jadi protease termostabil dengan sifat fisik dan kimia yang lebih baik merupakan enzim yang tepat untuk aplikasi dalam beberapa

proses yang berlangsung pada suhu tinggi. Penggunaannya di industri detergen sebagai aditif dan industri keju merupakan contoh aplikasi protease termostabil (Parvaresh *et al.*, 1990).

2.7.2 Amilase

Amilase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis pati menjadi dekstrin, maltosa, dan glukosa (Ajayi dan Fragede, 2003). Amilase juga dapat bekerja pada glikogen dan derivat polisakarida lainnya. Amilase dapat digolongkan dalam 2 kelompok, yaitu endoamilase dan eksoamilase (Tester *et al.*, 2004).

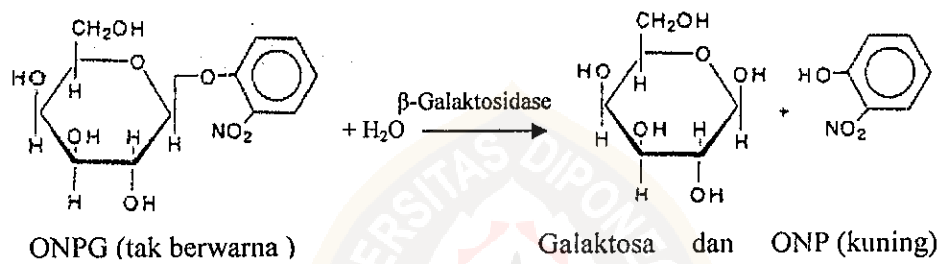
Enzim amilase dapat memutuskan ikatan 1-1, 1-4, dan 1-6 glikosida pada substrat yang digunakan. Enzim amilase aktif pada temperatur tinggi. Untuk proses ekonomis, dibutuhkan amilase termostabil (Krzyzaniak *et al.*, 2003).

Amilase termostabil banyak digunakan dalam industri pati, bidang medis, kimia analitik, tekstil, industri makanan, fermentasi, kertas dan industri *brewing*. Enzim amilase yang digunakan pada industri banyak diproduksi dari jamur dan bakteri (Reddy *et al.*, 2003).

2.7.3 β -Galaktosidase

Enzim β -galaktosidase dapat menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa yang lebih larut dan lebih manis daripada glukosa. Enzim ini dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme yang menggunakan laktosa sebagai sumber energinya (Moeini *et al.*, 2004).

Aktivitas β -galaktosidase dapat diketahui dengan metode fisik, kimia, dan biokimia. ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranosida) dapat digunakan sebagai substrat untuk identifikasi β -galaktosidase (Pestova dan Morrison, 1998). ONPG merupakan senyawa tak berwarna, tetapi hasil hidrolisisnya, yaitu ONP (o-nitrofenol) berwarna kuning pada larutan alkali. Reaksi hidrolisis ONPG ditunjukkan oleh gambar 2.3 (Sambrook dan Russel, 2001).



Gambar 2.3. Reaksi hidrolisis ONPG

Sintesis β -galaktosidase membutuhkan laktosa sebagai inducer dengan menumbuhkan kultur pada media yang mengandung 0,5 % laktosa (Drouault *et al.*, 2002).

2.8. Enzim Ekstraseluler

Enzim ekstraseluler adalah enzim yang dimiliki oleh bakteri dan disekresikan ke lingkungan atau media. Enzim hanya berinteraksi dengan substrat yang spesifik. Dalam identifikasi enzim ekstraseluler, aktivitas enzim dapat ditunjukkan dengan menambahkan substrat yang tepat ke dalam media pertumbuhan bakteri.

Enzim ekstraseluler dapat diidentifikasi dengan menggunakan substrat yang sesuai dengan enzim yang diinginkan seperti pati untuk mengidentifikasi amilase (Reddy, *et al.*, 2003), gelatin untuk mengidentifikasi protease (Agullo, 1955), dan laktosa untuk identifikasi β -galaktosidase (Drouault *et al.*, 2002) ke dalam media yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri. Zona jernih di sekitar koloni organisme (uji amilase), adanya perubahan warna (uji β -galaktosidase) dan terjadinya perubahan bentuk (uji protease) mengindikasikan adanya enzim ekstraseluler (Salle, 1993).

