

Isolasi Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gedongsongo dengan Media Pengaya Minimal YT (Yeast Tripton) serta Identifikasi Genotipik dan Fenotipik

Annisa Rachma^a, Purbowatiningrum Ria Sarjono^{a*}, Agustina L. N. Aminin^a

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: purbowatining@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
Thermophilic, DNA
isolation,
extracellular
enzymes

Kata kunci:
termofilik, isolasi
DNA, enzim
ekstraseluler

Abstract

The exploration of novel microorganisms is important because of their enormous potentials as source of biomolecules, for example enzymes, antimicrobial, anticancer, bioremediation agents, and biofuel resources. Up until now, less than 1 % bacteria in nature are cultivated. The industrial demands toward biomolecules that can stand in extreme conditions are increased. One of biomolecule potential sources is thermophilic bacteria. Indonesia has a number of geothermic regions, however, the exploration of thermophilic bacteria from Indonesian hot spring is very limited. The purposes of this research are to isolate the thermophilic bacteria from Gedong Songo hot spring using minimal YT (Yeast Tripton) medium in anaerobic condition and analyzing the genotypic and phenotypic character of the isolate. The thermophilic bacteria from Gedong Songo hot springs has been isolated using minimal YT medium in anaerobe condition, named the isolate of GS YTan. The bacterial identification has been carried out within genotypic and phenotypic characters. The genotypic character has been analyzed based on nucleotide sequences of 16S rRNA gene. The phenotypic natures are analyzed toward morphological test using gram staining and microscopic method. Besides, the isolate of GS YTan is analyzed potential extracellular thermostable enzymes, include amylase, protease, β -galactosidase, and cellulase. This research successfully isolate thermophilic anaerobe bacteria, namely the isolate of GS YTan. This isolate has characteristic bacilli and gram positive. Based on genotypic nature, the isolate of GS YTan has high homology with *Anoxybacillus sp.* groups with similarity rates about 97-99 %. This isolate has the closest relation with *Anoxybacillus sp. AF/o4* and *Anoxybacillus sp. HT14*. This isolate also has potential extracellular thermostable enzymes, include amylase, protease, and β -galactosidase.

Abstrak

Eksplorasi mikroorganisme baru merupakan suatu hal yang penting, karena mikroorganisme mempunyai potensi yang sangat luas sebagai sumber biomolekul baru seperti enzim, antimikroba, antikanker, agen bioremediasi, dan penghasil bahan bakar hayati. Hingga saat ini, kurang dari 1% bakteri di alam yang berhasil dikultivasi. Kebutuhan industri terhadap biomolekul yang tahan terhadap kondisi ekstrem sangatlah tinggi. Salah satu sumber biomolekul yang potensial adalah bakteri termofilik. Indonesia kaya akan habitat termofilik, khususnya sumber air panas, namun eksplorasinya masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat tunggal bakteri termofilik dari sumber air panas Gedong Songo dengan media minimal YT (Yeast Tripton) dalam kondisi anaerob serta melakukan identifikasi bakteri termofilik tersebut secara genotipik dan fenotipik. Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri termofilik sumber

air panas Gedongsongo dengan media pengaya minimal YT pada kondisi anaerob serta identifikasi bakteri secara genotipik dan fenotipik. Identifikasi genotipik dilakukan dengan menggunakan analisis urutan nukleotida gen 16S rRNA. Identifikasi fenotipik dilakukan melalui uji morfologi meliputi uji pewarnaan gram dan uji mikroskop. Selain itu dilakukan uji potensi enzim ekstraseluler termostabil, meliputi amilase, protease, β -galaktosidase, dan selulase. Hasil penelitian diperoleh isolat tunggal bakteri termofilik anaerob yang diberi nama isolat GS Ytan, dengan karakteristik bentuk batang, gram positif, dan memiliki kemiripan dengan bakteri kelompok *Anoxybacillus sp.* dengan tingkat kekerabatan sebesar 97-99 %. Isolat GS YTan memiliki hubungan terdekat dengan *Anoxybacillus sp. AF/o4*, dan *Anoxybacillus sp. HT14*. Isolat GS YTan memiliki potensi enzim ekstraseluler termostabil amilase, protease dan β -galaktosidase.

1. Pendahuluan

Eksplorasi mikroorganisme baru merupakan suatu hal yang penting karena mikroorganisme mempunyai potensi yang sangat luas sebagai sumber biomolekul baru seperti enzim, antimikroba, antikanker, agen bioremediasi, dan penghasil bahan bakar hayati. Namun hingga saat ini, eksplorasi mengenai mikroorganisme terutama bakteri masih sangat sedikit, kurang dari 1% bakteri di alam yang telah terkultivasi [1].

Kebutuhan industri terhadap biomolekul yang tahan kondisi ekstrem sangatlah tinggi. Hal ini karena kebanyakan biomolekul (misalnya enzim) tidak dapat bertahan pada temperatur tinggi [2]. Berdasarkan alasan tersebut, perlu dilakukan eksplorasi biomolekul yang bersumber dari organisme termofilik.

Bakteri termofilik merupakan bakteri ekstremofil yang mampu bertahan hidup pada suhu tinggi [3]. Bakteri termofilik dapat ditemukan di sumber mata air panas, kawah gunung berapi, serta gunung api bawah laut [4]. Indonesia merupakan salah satu daerah tektonik di dunia dengan lebih dari 70 gunung tektonik aktif sebagai salah satu habitat hidup bakteri termofilik. Namun, eksplorasi dan publikasi bakteri termofilik yang berasal dari Indonesia masih sangat terbatas [5]. Beberapa bakteri termofilik yang telah berhasil diisolasi di Indonesia antara lain *Bacillus thermophilus* isolat BTC16 dari sumber air panas Cimanggu Bandung Jawa Barat [6] dan *Thermoanaerobacter yonseiensis sp. strain KB-1* yang diisolasi dari sumber air panas Sileri [7].

Aminin, *dkk.* [5] telah berhasil mengidentifikasi adanya bakteri-bakteri baru khas sumber air panas Gedongsongo dengan menggunakan metode pendekatan minimal media dan dalam kondisi anaerob. Namun seluruhnya masih dalam bentuk kultur campuran dan belum diketahui potensinya, oleh karena itu diperlukan upaya mengisolasi untuk mendapatkan isolat tunggal dan menentukan potensinya. Pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri termofilik dari sumber air panas Gedongsongo menggunakan media minimal YT (Yeast Tryptone) secara anaerob dan identifikasi jenis bakteri termofilik menggunakan analisis urutan nukleotida gen 16S rRNA dan konstruksi pohon filogenetiknya. Selain itu dilakukan identifikasi fenotipik melalui uji pewarnaan gram serta identifikasi potensi enzim termostabil ekstraseluler meliputi amilase, protease, β -galaktosidase, dan selulase.

2. Metodologi Penelitian

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi aotuklaf, cawan petri, corong gelas, Fotomikrograf, gelas beker, inkas, inkubator, jarum ose, kaca preparat, kertas pH indikator, labu erlenmeyer, Laminar Air Flow, lampu spiritus, lemari pendingin, Mesin Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer), mikrosentrifus (Hettich Zentrifugen Micro 200R), Mikroskop, mikrotube, neraca analitik, pipet mikro, tabung reaksi tertutup, dan UV Transiluminator.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuabides, akuades, bacto agar, buffer TBE (Tris Borat EDTA), CMC, ekstrak ragi, etanol 70%, etanol absolut, EtBr (etidium bromida), gelatin, gel agarosa, isoamil alkohol, isopropanol, kloroform, laktosa, larutan Iodin dalam KI, larutan kristal violet, MMB (Mega Mix Blue) PCR kit, NaCl, natrium EDTA, natrium fosfat, pati, primer 8-27F, primer 1492R, proteinase K, safranin, sampel dari sumber air panas Gedongsongo, SDS, tripton, Tris-HCl.

Pembiakan Bakteri

Air sampel dibiakkan dalam media minimal menggunakan media pengaya YT. Kultivasi dilakukan pada suhu 55 oC dan dalam kondisi anaerobik (kondisi tanpa oksigen) dengan cara media biakkan ditempatkan pada tabung reaksi tertutup, kemudian dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang berisi nyala lilin (simple candle jar methode). Inkubasi dihentikan saat timbul kekeruhan. Kultur yang telah tumbuh kemudian diisolasi untuk mendapatkan koloni tunggal.

Isolasi DNA Kromosom

DNA diisolasi menggunakan metode Zhou yang dimodifikasi [8]. Pellet sel dicampur dengan 300 μ L larutan ekstraksi DNA (100 mM Tris-HCl [pH 8], 100 mM natrium EDTA [pH 8], 100 mM natrium fosfat [pH 8] dan 1,5 M NaCl). Larutan kemudian ditambah dengan 10 μ L proteinase K (20 mg/mL) dan pasir steril, kemudian digojog selama 10 menit. Langkah selanjutnya adalah penambahan 30 μ L SDS (Sodium Dodesil Sulfonat) 20 % dan sampel diinkubasi pada suhu 60 oC selama 1 jam dengan digojog setiap 10-20 menit. Supernatan yang dikumpulkan setelah sentrifugasi dengan kecepatan

5000 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar dan dipindahkan ke dalam mikrotube baru. Supernatan ditambahkan kloroform-isoamil alkohol (24:1, v/v) sejumlah volume yang sama dengan volume supernatan, kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit pada temperatur ruang. Penambahan kloroform-isoamil alkohol diulangi sampai 3 kali pengulangan (triplo). Supernatan dikumpulkan dan dipindahkan ke mikrotube baru untuk selanjutnya ditambahkan isopropanol sejumlah volume yang sama dengan volume supernatan, lalu didiamkan selama 15 menit pada temperatur ruang. Setelah didiamkan, supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Endapan hasil sentrifugasi diambil dan dicuci dengan etanol 70% dingin, kemudian dicampur kembali dengan akuabides, untuk memperoleh volume akhir 50 μ L.

Amplifikasi Fragmen Nukleotida Gen 16S rRNA

Sampel DNA yang diperoleh dari proses isolasi DNA menggunakan metode Zhou [8] selanjutnya diamplifikasi gen 16S rRNA-nya secara in vitro dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction). Gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan 1 set primer 27F-1492R. Pasangan primer: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (posisi 8-7, penomoran E. coli) dan 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (posisi 1492, penomoran urutan basa E. coli). PCR dikerjakan menggunakan DNA Taq polimerase. Pada 5 μ L sampel hasil ekstraksi DNA ditambahkan 43 μ L MMB (Mega Mix Blue) PCR kit, 1 μ L primer 8-27F, dan 1 μ L primer 1492R. Amplifikasi dilakukan dalam 30 putaran. Temperatur dan waktu PCR yang diatur adalah denaturasi pada suhu 94 oC selama 45 detik, annealing pada suhu 54 oC selama 30 detik, dan extension primer pada suhu 72 oC selama 2 menit. Pada akhir extention putaran 30, suhu PCR diturunkan secara drastis hingga 4°C.

Elektroforesis Gel Agarosa

Gel agarosa (1 %) dibuat dengan melarutkan 0,2 gram agarosa ke dalam buffer TBE (Tris Borat EDTA) 5X hingga volume 20 mL lalu dididihkan. Proses selanjutnya yaitu penambahan EtBr (Etidium Bromida) ke dalam gel dan gel dimasukan ke dalam cetakan yang sudah terpasang sisir untuk membuat sumur-sumur gel (well). Gel yang telah memadat dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan direndam dengan buffer TBE. Sejumlah 5 μ L unit DNA hasil amplifikasi kemudian dimasukkan kedalam sumur gel. Elektroforesis dimulai dengan arus 400 mA dan tegangan 100 V dan dihentikan apabila perpindahan sampel telah sampai pada batas yang ditentukan. Gel hasil elektroforesis diamati di bawah sinar UV menggunakan UV Transiluminator.

Analisis Sekuensing

Fragmen DNA hasil PCR disekuensing untuk menentukan urutan nukleotidanya. Sekuensing dilakukan di Korea oleh Macrogen Sequencing Service menggunakan ABI PrismR 3100 Genetic Analyzer.

Hasil sekuensing diperoleh berupa urutan nukleotida DNA yang masing-masing diterjemahkan menggunakan 2 buah primer, yaitu primer 8-27R dan

1492F. Urutan nukleotida hasil sekuensing disambung menggunakan program EditSeq menghasilkan keluaran berupa file yang akan dimasukkan ke dalam program SeqMan (kedua program tersebut terdapat dalam program DNASTAR). Hasil keluaran program SeqMan berupa urutan nukleotida yang utuh untuk selanjutnya dibandingkan dengan data base GenBank dan dilakukan studi Filogeni.

Studi Filogeni

Urutan nukleotida hasil sekuensing dibandingkan dengan data base GenBank menggunakan program BLASTN pada Website NCBI (National Center for Biotechnology Information). Perbandingan urutan nukleotida hasil sekuensing dengan data base GenBank kemudian diujarkan menggunakan program CLUSTAL W dan diperoleh hasil keluaran dalam format aln dan phy dengan file keluaran dalam format phy akan dilakukan analisis selanjutnya menggunakan program Phylip (Phylogeni Inference Package) 3.68 ed. Program Phylip 3.68 ed. yang digunakan untuk menganalisis urutan nukleotida adalah seqboot, dnapars dan consense. Hasil keluaran program Phylip 3.68 berupa file newick yang akan dimasukkan kedalam website Phylodendron. Hasil keluaran program Phylodendron berupa pohon filogenetik.

Uji Pewarnaan Gram

Kaca preparat dibersihkan dengan menggunakan alkohol kemudian dipanaskan di dekat nyala api. Isolat bakteri ditetaskan di atas kaca preparat, kemudian dipanaskan di dekat nyala api hingga isolat bakteri kering. Langkah selanjutnya yaitu penetesan larutan kristal ungu pada isolat bakteri, lalu didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringkan di dekat nyala api. Hasil pewarnaan kristal ungu ditetaskan larutan iodin, didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringkan di dekat nyala api. Hasil pewarnaan iodin ditetaskan dengan etanol absolut, didiamkan selama 15-30 detik, dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringkan di dekat nyala api. Langkah terakhir, hasil pewarnaan dengan etanol absolut ditetesi dengan safranin, didiamkan selama 2 menit, dicuci dengan akuades mengalir, dan dikeringkan di dekat nyala api. Setelah kering, hasil pewarnaan gram di amati dibawah mikroskop.

Identifikasi Enzim Amilase Termotabil

Identifikasi enzim amilase dilakukan dengan membuat media agar yang ditambahkan dengan pati, kemudian dituang ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat. Isolat bakteri ditetaskan pada media yang telah memadat kemudian diinkubasi pada suhu 55°C. Inkubasi dilakukan hingga tumbuh koloni bakteri. Media yang telah ditumbuhi bakteri kemudian digenangi dengan larutan iodin dan didiamkan sekitar 1 menit agar iodin bereaksi.

Identifikasi Enzim Protease Termotabil

Isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media agar yang sudah ditambahkan gelatin, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C. Inkubasi dilakukan hingga timbul

kekeruhan. Hasil inkubasi kemudian disimpan di lemari es selama 24 jam.

Identifikasi enzim β - Galaktosidase Termotabil

Identifikasi enzim β - Galaktosidase dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam media yang sudah ditambahkan dengan laktosa, kemudian diinkubasi hingga timbul kekeruhan yang merupakan tanda telah tumbuhnya bakteri. Setelah diinkubasi, ke dalam media ditambahkan larutan ONPG, kemudian diinkubasi kembali selama 5 jam.

Identifikasi enzim Selulase Termotabil

Identifikasi enzim selulase dilakukan dengan menginokulasikan bakteri ke dalam media agar yang sudah ditambahkan dengan CMC, kemudian diinkubasi pada suhu 55 oC. Inkubasi dilakukan hingga tumbuh koloni bakteri. Media hasil inkubasi kemudian digenangi dengan larutan Congo red selama 20 menit, kemudian dicuci dengan larutan NaCl. Adanya aktivitas enzim selulase ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Pengaruh Waktu Karbonisasi terhadap Sintesis Porous Carbon

Pengambilan pelet yang belum dikarbonisasi sebelumnya, kemudian ditimbang masing-masing beratnya dan dimasukkan ke dalam furnace yang telah dialiri dengan gas nitrogen, variasi waktu yang dilakukan adalah 30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, 150 menit dan 180 menit. Hasil karbonisasi kemudian diambil, ditimbang dan dianalisis dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) dan Bruanuer Emmet Teller (BET).

Uji Adsoptivitas Porous Carbon Hasil Sintesis

Pengambilan masing-masing 0,1 gram porous carbon hasil karbonisasi dengan variasi waktu 30 menit, 60 menit, 90 menit, 120 menit, 150 menit dan 180 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin dan dilakukan pengovenan dalam temperatur 120°C selama 1 jam, hasil pengovenan kemudian ditimbang dan diletakkan ke dalam desikator yang sudah diletakkan cawan porselin berisi benzena di dalamnya dan didiamkan selama 24 jam di dalam desikator tersebut. Porous carbon yang sudah mengadsopsi benzena tersebut kemudian ditimbang.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolat tunggal bakteri termofilik (isolat GS YTan) diidentifikasi secara genotipik berdasarkan urutan nukleotida gen 16S rRNA. Untuk keperluan tersebut dilakukan isolasi DNA kromosom menggunakan metode Zhou [8] yang dimodifikasi.

Isolasi DNA kromosom menggunakan metode Zhou [8], pemecahan dinding sel dilakukan secara fisik dengan penambahan pasir steril, dan kimiawi dengan penambahan larutan pelisis dinding sel, proteinase K dan SDS.

Proses selanjutnya adalah pemurnian DNA. Proses pemurnian DNA dilakukan dengan ekstraksi menggunakan kloroform-isoamil alkohol. Penambahan kloroform-isoamil alkohol mengakibatkan denaturasi protein, namun proses ini tidak akan mendenaturasi DNA. DNA akan terlarut dalam lapisan yang lebih polar (lapisan isoamil alkohol) sesuai prinsip pelarutan, *like dissolves like*. Selain itu isoamil-alkohol juga berfungsi mengurangi pembentukan busa selama proses ekstraksi [9].

Supernatan yang mengandung DNA didalamnya akan diendapkan DNA nya dengan penambahan isopropanol. DNA yang mengendap dibersihkan dari pengotor-pengotornya dengan penambahan etanol.

DNA yang telah diisolasi dari isolat GS YTan kemudian diamplifikasi (digandakan) gen 16S rRNANYA menggunakan metode PCR. Templat DNA yang akan digandakan dibatasi oleh sepasang primer (8-27F dan 1492R). Primer akan membatasi amplifikasi gen 16S rRNA pada posisi nukleotida 8-27 dan 1492-1510 sesuai penomoran *E. coli*.

Fragmen DNA hasil amplifikasi (amplikon) dianalisis menggunakan metode elektroforesis gel agarosa. Prinsip elektroforesis adalah memisahkan DNA berdasarkan perbedaan ukuran oleh medan listrik [9].

Fragmen gen 16S rRNA kemudian disekuensi untuk menentukan urutan nukleotidanya menggunakan primer 8-27F dan 1492R menghasilkan dua potong urutan nukleotida. Potongan nukleotida tersebut kemudian disambung menggunakan program EditSeq dan SeqMan yang terdapat pada program DNASTAR menghasilkan urutan keseluruhan nukleotida gen 16S rRNA isolat GS YTan.

Urutan nukleotida isolat GS YTan kemudian dibandingkan dengan data *base GenBank* pada website NCBI menggunakan BLASTN. Dari data BLASTN diperoleh data perbandingan nukleotida dengan 99 spesies pembanding dengan tingkat homologi sebesar 97-99 % seperti ditunjukkan pada tabel 1.

Mayoritas bakteri pembanding berasal dari kelompok *Anoxybacillus sp.*, sebagian kecil lainnya berasal dari kelompok *Geobacillus, sp., Uncultured bacterium, Thermal soil bacterium, dan Bacillus, sp.* Data urutan nukleotida dengan pembandingnya kemudian diujarkan menggunakan program Clustal W untuk digunakan merekonstruksi pohon filogenetik.

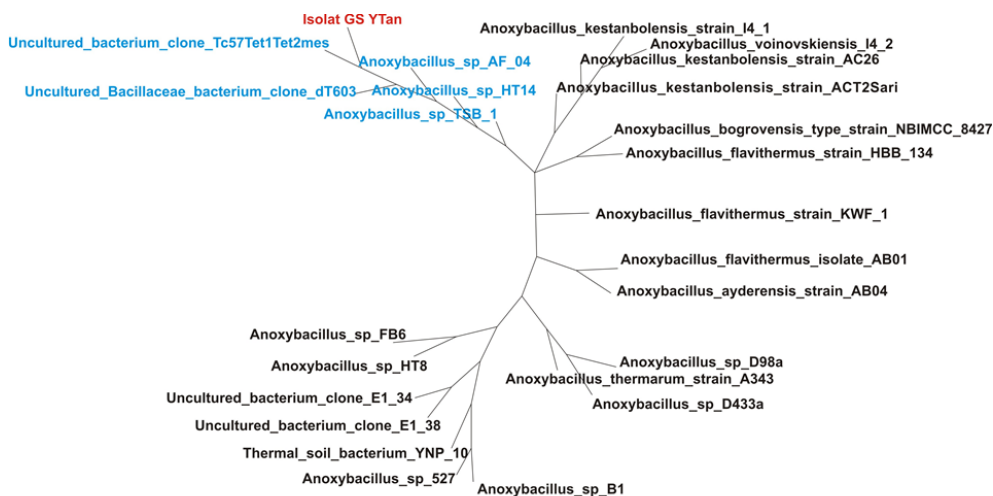
```

1      GCTATACATG CAGTCGAGCG GACCGAAAAG AAGCTTGCTT CGATTTCGGTT AGCGGCGGAC
61     GGGTGAGTAA CACGTGGGCA ACCTGCCCTG TAGACGGGGA TAACACCGAG AAATCGGTGC
121    TAATACCGGA TAATACGAAA TGTCGCATGA CGTTTCGTTG AAAGGCGGCG CAAGCTGTGG
181    CTACAGGATG GGCCCGCGGC GCATTAGCTA GTTGGTGAGG TAACGGCTCA CCAGGCGGAC
241    GATGCGTAGC CGACCTGAGA GGGTGATCGG CCACACTGGG ACTGAGACAC GGCCAGACT
301    CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC GCAATGGACG AAAGTCTGAC GGAGCAACGC
361    CGCGTGAGCG AAGAAGGTCT TCGGATTGTA AAGCTCTGTT GTTAGGGGAG AACAAGTACC
421    GCAGTAACTG GCGGTACCTT GACGGTACCT AACGAGAAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
481    GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGCGCGC
541    GCAGGCGGTC CTTTAAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC AACCGTGGAG GGTCAATTGGA
601    AACTGGGGGA CTTGAGTGCA GAAGAGGAGA GCGGAATTCC TACGTGTAGC GGTGAAATGC
661    GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGGCTCTC TGGTCTGTAA CTGACGCTGA
721    GGCGCGAAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG CCGTAAACGA
781    TGAGTGTCTA GTGTTAGAGG GGTTACACCC TTTAGTGCTG TAGCTAACGC ATTAAGCACT
841    CCGCCTGGGG AGTACGCTCG CAAGAGTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA
901    GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTGCAAGCA ACGCGAAGAA CCTTACCAGG TCTTGACATC
961    CCTTGACAAC CCAAGAGATT GGGCGTTCCC CTTGCGGGGA CAAGGTGACA GGTGGTGCA
1021   GGTGTGTCGTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCT
1081   GACCTTAGTT GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGATGA CAAATCGGAG
1141   GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA CAGGTGCTAC
1201   AATGGGCGGT ACAAAGGGTT GCAAACCCGC GAGGGGGAGC CAATCCCAA AAGCCGCTCT
1261   CAGTTCGGAT TGCAGGCTGC AACTCGCCTG CATGAAGCCG GAATCGCTAG TAATCGCGGA
1321   TCAGTACGCC GCGGTGAATA CGTTCCGGGG CTTTGTACAC ACCGCCGCTG ACACCACGAG
1381   AGTTTGCAAC ACCCGAAGTC GGTGTAGGTA ACCCTCNCGG GAGCCAGCCG CCGTAAGGTT
    
```

Gambar 1 Urutan keseluruhan nukleotida gen 16S rRNA isolat GS Ytan

Tabel 1 Sebagian Hasil Perbandingan Nukleotida dengan Metode BLASTN

| Accession | Description | Max score | Total score | Query coverage | E value | Max ident |
|-----------------------------|---|-----------|-------------|----------------|---------|-----------|
| GQ265906.1 | Anoxybacillus voinovskiensis strain I4.2 16S ribosomal RNA gene, | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| GQ265905.1 | Anoxybacillus voinovskiensis strain B9.3 16S ribosomal RNA gene, | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| EF600594.1 | Uncultured bacterium clone E1-15 16S ribosomal RNA gene, partial | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| AJ618979.1 | Anoxybacillus amylolyticus 16S rRNA gene, type strain MR3C | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| NR_029006.1 | Anoxybacillus contaminans strain R-16222 16S ribosomal RNA, par | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| NR_024818.1 | Anoxybacillus voinovskiensis strain TH13 16S ribosomal RNA, parti | 785 | 785 | 100% | 0.0 | 99% |
| EU542521.1 | Uncultured bacterium clone Er-LLAYS-6S 16S ribosomal RNA gene, | 780 | 780 | 100% | 0.0 | 99% |
| DQ452023.1 | Anoxybacillus sp. FB9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 780 | 780 | 100% | 0.0 | 99% |
| DQ452022.1 | Anoxybacillus sp. HT8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 780 | 780 | 100% | 0.0 | 99% |
| DQ452020.1 | Anoxybacillus sp. FB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 780 | 780 | 100% | 0.0 | 99% |
| DQ452021.1 | Anoxybacillus sp. FB7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 776 | 776 | 100% | 0.0 | 99% |
| EF600597.1 | Uncultured bacterium clone E1-38 16S ribosomal RNA gene, partial | 774 | 774 | 100% | 0.0 | 99% |
| EF600596.1 | Uncultured bacterium clone E1-34 16S ribosomal RNA gene, partial | 774 | 774 | 100% | 0.0 | 99% |
| AJ306648.1 | Uncultured Saccharococcus sp. partial 16S rRNA gene, clone ETV-T | 774 | 774 | 100% | 0.0 | 99% |
| FN428691.1 | Geobacillus tepidamans partial 16S rRNA gene, strain R-35643 | 769 | 769 | 100% | 0.0 | 98% |
| GQ065703.1 | Uncultured bacterium clone nbw91h11c1 16S ribosomal RNA gene, | 750 | 750 | 99% | 0.0 | 98% |
| FJ430021.1 | Anoxybacillus sp. D98a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 750 | 750 | 100% | 0.0 | 98% |
| FJ430006.1 | Geobacillus sp. A413 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 750 | 750 | 100% | 0.0 | 98% |
| AY248710.1 | Anoxybacillus kestanbolinensis strain K2 16S ribosomal RNA gene, | 750 | 750 | 100% | 0.0 | 98% |
| AY327448.1 | Geobacillus sp. SF03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 750 | 750 | 100% | 0.0 | 98% |
| EU326496.2 | Anoxybacillus thermarum strain A343 16S ribosomal RNA gene, co | 747 | 747 | 100% | 0.0 | 97% |



Gambar 2 Pohon filogeni Isolat GS YTan menggunakan metode parsimony dalam bentuk tree diag. Bakteri yang memiliki kekerabatan sangat dekat (biru), bakteri yang memiliki kekerabatan cukup dekat (hitam)

Konstruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan program Phylip (*Phylogeny Inference Package*) 3.68 ed. dengan metode *parsimony*. Pohon filogeni yang dihasilkan menunjukkan kekerabatan isolat GS YTan dengan 99 spesies lainnya.

Berdasarkan pohon filogeni dari 100 spesies bakteri tersebut dipilih 24 spesies bakteri yang memiliki kekerabatan terdekat dengan isolat GS YTan untuk dibandingkan lebih lanjut dan dihasilkan pohon filogeni yang lebih spesifik dari 25 spesies bakteri.

Berdasarkan hasil uji pewarnaan gram, isolat GS YT an merupakan bakteri yang berbentuk batang (*bacilli*) dan gram positif. hal ini terlihat dari terbentuknya warna ungu pada akhir pewarnaan gram. Warna ungu yang dihasilkan merupakan hasil pewarnaan dari kristal violet yang diperjelas dengan adanya iodine. Pemberian pewarna kristal ungu dan iodine akan membentuk kompleks kristal ungu-iodine yang terjerap pada lapisan peptidoglikan. Penambahan etanol absolut hanya akan mendehidrasi sedikit lapisan peptidoglikan dan menyebabkan pori peptidoglikan mengkerut sehingga mencegah terlepasnya kompleks kristal ungu-iodine. Pemberian safranin tidak memberikan pengaruh apa-apa, karena dinding sel tetap berwarna ungu [10].

Berdasarkan identifikasi enzim ekstraseluler termotabil, isolat GS YTan memiliki potensi enzim amilase, protease dan β -galaktosidase. Namun, isolat GS YTan tidak memiliki potensi enzim selulase.

4. Kesimpulan

Isolat tunggal bakteri termofilik anaerob yang diberi mana isolat GS YTan yang memiliki karakteristik bentuk batang, gram positif, dan memiliki kemiripan dengan bakteri kelompok *Anoxybacillus sp.* dengan tingkat kekerabatan sebesar 97-99 %. Isolat GS YTan memiliki hubungan terdekat dengan *Anoxybacillus sp. AF/04* dan *Anoxybacillus sp. HT14*. Isolat GS YTan memiliki potensi enzim ekstraseluler termotabil amilase, protease dan β -galaktosidase.

5. Daftar pustaka

- [1] Rudolf I. Amann, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological reviews*, 59 (1995) 143-169.
- [2] Michael T Madigan, John M Martinko, Jack Parker, *Biology of microorganism*, Prentice Hall, England, 1997.
- [3] Sarah Maloney, *Extremophiles, Bioprospecting For Antimicrobials*, in, International Medical Press, Carleton College, 2002.
- [4] S.M. Friedman, *Biochemistry of thermophily*, Academic Press, 1978.
- [5] Agustina Lulustyaningati Nurul Aminin, Fida Madayanti Warganegara, Pingkan Aditiawati, Simple enrichment and independent cultures to expand bacterial community analysis from gedongsongo hot

spring, *Journal of bioscience and bioengineering*, 106 (2008) 211-214.

- [6] I.N Tika, Studi Biokimia Enzim DNA Poilmerase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Isolat Lokal, in, ITB Central Lab, Bandung, 2005.
- [7] Byoung-Chan Kim, Ralf Grote, Dong-Woo Lee, Garabed Antranikian, Yu-Ryang Pyun, *Thermoanaerobacter yonseiensis sp. nov.*, a novel extremely thermophilic, xylose-utilizing bacterium that grows at up to 85 degrees C, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51 (2001) 1539-1548.
- [8] Jizhong Zhou, Mary Ann Bruns, James M Tiedje, DNA recovery from soils of diverse composition, *Applied and environmental microbiology*, 62 (1996) 316-322.
- [9] J Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual-* /Joseph Sambrook, David W. Russell; [assoc. ed.: Nina Irwin, Kaaren A. Janssen], (2001).
- [10] K Todar, *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Retrieved September 27, 2005, in, 2004.