

Studi Filogeni dan Uji Potensi Antibakteri serta Enzim Ekstraseluler Isolat *Geobacillus* sp. dari Sumber Air Panas Gedongsongo

Ifsantin Nihaya^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

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

Article Info

Keywords:
thermophilic
bacteria, phylogeny,
antibacterial,
extracellular
enzyme, *Geobacillus*
sp.

Kata Kunci:
bakteri termofilik,
filogeni,
antibakteri, enzim
ekstraseluler,
Geobacillus sp.

Abstract

Research on the study of phylogeny and test of antibacterial potency and extracellular enzyme isolate *Geobacillus* sp. from Gedongsongo hot spring has been done. This study aims to explore the potential of *Geobacillus* sp. through the construction of phylogeny trees and to know its molecular potentials include antibacterial and extracellular enzymes xylanase and cellulase. The construction of phylogeny tree was done using Phylip 3.68 ed program, Distance Matrix method (Neighboring joining) with parameter F48. It also tested the antibacterial potential of secondary metabolites of *Geobacillus* sp. dYTae-14 and dGae-3 by perforation diffusion method against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Extracellular enzyme test of xylanase and cellulase was done qualitatively. The results of phylogeny tree construction show that these eight strains are *Geobacillus* sp. typical of Gedongsongo whose kinship is very close to each other and has a kinship relationship with the bacteria *Bacillus caldotenax* strain BCRC 11956, *Geobacillus kaustophilus* subsp. *Vulgivagus* strain CDZ 1 and *Geobacillus thermoleovorans* sp. Isolate *Geobacillus* sp. dYTae-14 and dGae-3 tested for their antibacterial potency showed no antibacterial potential against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Eight isolates *Geobacillus* sp. does not show the potential for extracellular enzyme xylanase and cellulase.

Abstrak

Penelitian tentang studi filogeni dan uji potensi antibakteri serta enzim ekstraseluler isolat *Geobacillus* sp. dari sumber air panas gedongsongo telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menelusuri potensi *Geobacillus* sp. melalui konstruksi pohon filogeni serta mengetahui potensi-potensi molekulernya meliputi potensi antibakteri dan enzim ekstraseluler xilanase dan selulase. Konstruksi pohon filogeni dilakukan menggunakan program Phylip 3.68 ed, metode Distance matriks (Neighbour joining) dengan parameter F48. Selain itu juga diuji potensi antibakteri dari metabolit sekunder *Geobacillus* sp. dYTae-14 dan dGae-3 dengan metode difusi perforasi terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Uji enzim ekstraseluler xilanase dan selulase dilakukan secara kualitatif. Hasil konstruksi pohon filogeni menunjukkan bahwa kedelapan strain ini merupakan *Geobacillus* sp. khas Gedongsongo yang hubungan kekerabatannya sangat dekat satu sama lain dan mempunyai hubungan kekerabatan dengan bakteri *Bacillus caldotenax* strain BCRC 11956, *Geobacillus kaustophilus* subsp. *Vulgivagus* strain CDZ 1 dan *Geobacillus thermoleovorans* sp. Isolat *Geobacillus* sp. dYTae-14 dan dGae-3 yang diuji potensi antibakterinya tidak menunjukkan adanya potensi antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Kedelapan isolat *Geobacillus* sp. tidak menunjukkan potensi adanya enzim ekstraseluler xilanase dan selulase.

1. Pendahuluan

Bakteri ekstremofil merupakan mikroorganisme yang tumbuh dengan subur dalam lingkungan yang ekstrem [1]. Salah satu jenis bakteri ekstremofil adalah bakteri termofilik yang mampu bertahan hidup pada temperatur tinggi yaitu pada 45 °C sampai lebih dari 70 °C [2]. Bakteri ini umumnya dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti kompos, limbah, tanah dan air [3]. Dari kompos panas, ditemukan *Bacillus stearothermophilus* yang hidup pada temperatur 65-69 °C [4]. Selain itu, beberapa jenis bakteri aerobik termofilik juga telah diisolasi dari sumber air panas di Fiji yang hidup pada suhu 45-85 °C dan bahkan mampu bertahan sampai suhu 90 °C [5].

Isolasi delapan bakteri termofilik *Geobacillus sp.* dari sumber air panas Gedongsongo. Identifikasi isolat-isolat tersebut telah dilakukan berdasarkan urutan nukleotida gen 16S rRNANYA, tapi hingga saat ini belum ditelusuri potensi molekulernya berdasarkan hubungan kekerabatannya. Identifikasi hubungan kekerabatan antibakteri dapat dilakukan berdasarkan urutan nukleotida gen 16S-rRNA. Bakteri termofilik mempunyai beberapa potensi yaitu dapat menghasilkan enzim, antibiotik, komponen anti-alga dan zat anti kanker [6].

Salah satu potensinya adalah sebagai agen antibakteri, sejauh ini telah ditemukan senyawa antibakteri dari *Yersinia sp.1* dan *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari sumber air panas di Jordan. Senyawa antibakteri dari bakteri termofilik ini mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Selain itu, termofilik *Bacillus specie SAT-4* menghasilkan antibiotik yang stabil pada suhu tinggi dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *S.aureus* dan *Micrococcus luteus*. Pencarian antibakteri alternatif perlu dilakukan mengingat semakin banyak bakteri patogenik yang menjadi resisten terhadap antibakteri yang sudah ada [7].

Selain berpotensi sebagai antibakteri, bakteri termofilik juga dapat menghasilkan enzim ekstraseluler termostabil. Enzim termostabil mempunyai banyak manfaat yaitu tahan pada suhu tinggi, peningkatan kecepatan reaksi, meningkatkan kelarutan substrat dan mengurangi resiko kontaminan dari mikroorganisme patogen [8].

2. Metode Penelitian

Alat & Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (*Memmert model 300*), mikropipet, *shaker*, inkubator *shaker* (*Memmert*), spektronic 20, autoklaf klinis (*Clinical autoclave prestige medical series 2100*), cawan petri, sentrifuge (*Beckman model J2-21*), jarum ose, aluminium foil, kulkas (*Sharp dan Panasonic*), kapas, botol semprot serta alat-alat gelas. Bahan yang digunakan adalah delapan isolat *Geobacillus sp.*, bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*, media BSM (*Basal salt medium*), Media NA (*Nutrien agar*), Media NB (*Nutrien broth*), Nutrisi YT (*Yeast tripton*), Nutrisi NB (*Nutrient*

Broth), Congo red, Xilan, Carboxy Methyl Cellulose, Glukosa, Alkohol 70%, dan akuades.

Studi Filogeni

Studi filogeni dengan cara dikonstruksi pohon filogeninya menggunakan program *Phylip 3,68 ed Metode Distance Matrics (Neighbour joining)* dengan parameter F48.

Strain bakteri

Geobacillus strain dGae-3, dNBae-1, dNBae-3X, dYTae-1, dYTae-3, dYTae-5, dYTae-13 dan dYTae-14 merupakan bakteri yang diisolasi dari sumber air panas Gedong Songo, Semarang [9]. Bakteri ini dikulturkan dalam media *Basal salt medium* (pH 6) [10] dengan penambahan nutrisi 0,05% glukosa, yeast ekstrak dan *nutrient broth* dan diinkubasi pada suhu 55°C.

Produksi senyawa antibakteri

Sebanyak 25µL isolat *Geobacillus* dari media stater diinokulasikan kedalam 250mL media BSM cair dan diinkubasi pada suhu 55°C. Inkubasi dihentikan pada fase kematian. Setelah mencapai fase kematian, campuran kultur disentrifugasi pada 5000 rpm sehingga didapatkan supernatan.

Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metoda difusi agar secara perforasi. Bakteri penguji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Kedalam cawan petri dimasukkan biakan bakteri penguji dalam media nutrien agar cair steril. Setelah dingin, media kemudian dilubangi dengan alat pelubang. Kemudian pada lubang tersebut dimasukkan supernatan hasil fermentasi. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 30°C dan dilakukan pengamatan diameter hambatan yang terjadi disekitar lubang.

Uji enzim ekstraseluler

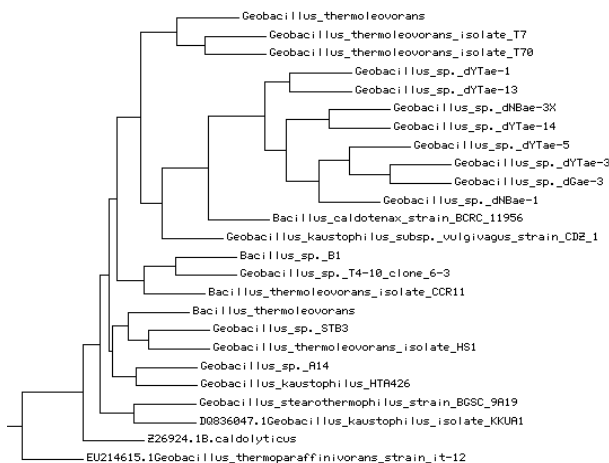
Aktivitas xilanase diukur dengan uji kemampuan enzim kasar menghidrolisis xilan menjadi gula reduksi. Analisis gula reduksi dilakukan dengan menggunakan pereaksi DNS. Sedangkan aktivitas selulase dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri *Geobacillus sp.* pada media padat BSM yang mengandung 0,5% CMC, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C. Setelah inkubasi, ditambahkan larutan penguji congo red dan dicuci dengan menggunakan larutan NaCl. Terbentuknya zona bening menunjukkan adanya aktivitas enzim selulase.

3. Hasil Dan Pembahasan

Studi Filogeni

Data urutan nukleotida gen 16S rRNA isolat *Geobacillus sp.* dGae-3, dNBae-1, dNBae-3X, dYTae-1, dYTae-3, dYTae-5, dYTae-13 dan dYTae-14 telah didaftarkan pada *Genebank National Centre of Biotechnology Information (NCBI)*. Urutan-urutan tersebut kemudian dibandingkan dengan data dalam *Genebank* menggunakan program BLAST N pada website *National Centre of Biotechnology Information (NCBI)*.

Konstruksi pohon filogeni dilakukan dengan menggunakan program *Phylyp* 3.68 ed, metode *distance matrix* dengan parameter F48. Hasil konstruksi pohon filogeni masing-masing isolat *Geobacillus sp.* pada gambar 1 menunjukkan bahwa kedelapan isolat *Geobacillus sp.* ini berada dalam satu kelompok kekerabatan yang sangat dekat satu sama lain.



Gambar 1. Hasil konstruksi pohon filogeni dengan program *Phylyp* 3.68 ed metode *Distance matrix* parameter *Neighbour joining*

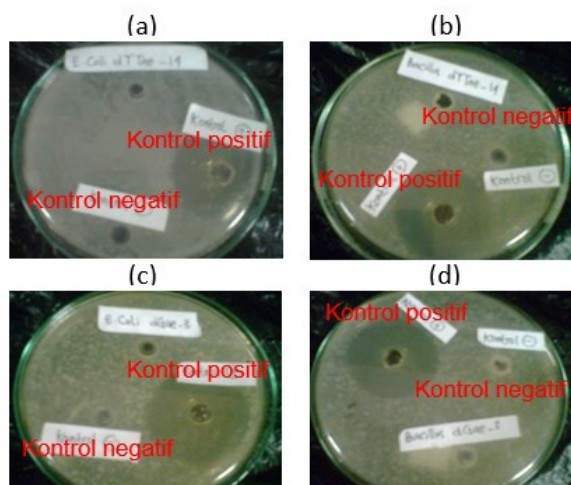
Kedelapan isolat *Geobacillus sp.* ini mempunyai tingkat kekerabatan yang berdekatan dengan bakteri-bakteri termofilik yang lain terutama dengan *Bacillus caldodenax* strain BCRC 11956 dan *Geobacillus kaustophilus subsp. Vulgivagus* strain CDZ 1. Bakteri termofilik *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus thermoleovorans* isolat T7 dan *Geobacillus thermoleovorans* isolat T70 merupakan bakteri yang memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan kedelapan isolat *Geobacillus sp.* setelah *Bacillus caldodenax* strain BCRC 11956 dan *Geobacillus kaustophilus subsp. Vulgivagus* strain CDZ 1.

Produksi senyawa antibakteri

Dari kedelapan strain isolat *Geobacillus sp.*, hanya dua strain *Geobacillus sp.* dGae-3 dan dYTae-14 yang berhasil diproduksi metabolit sekundernya. Sehingga hanya dua strain *Geobacillus sp.* saja yang akan diuji potensi antibakterinya. Hal ini karena pada keenam strain *Geobacillus sp.* yang lain sulit diikuti pola pertumbuhannya sehingga sulit menentukan fase kematian dimana pada fase ini terdapat metabolit sekunder yang akan diujikan.

Pengujian aktivitas antibakteri

Hasil uji potensi antibakteri dari strain *Geobacillus sp.* dGae-3 dan dYTae-14 terlihat pada gambar 2. Dari gambar 2 terlihat bahwa supernatan metabolit sekunder dari strain *Geobacillus sp.* dGae-3 dan dYTae-14 tidak membentuk zona bening.



Gambar 2. (a). Metabolit sekunder dYTae-14 terhadap *E.coli*; (b). Metabolit sekunder dYTae-14 terhadap *B.subtilis*; (c). Metabolite sekunder dGae-3 terhadap *E. coli* ; (d). Metabolit sekunder dGae-3 terhadap *B.subtilis* ;

Hal ini menunjukkan bahwa dua strain *Geobacillus sp.* dGae-3 dan dYTae-14 memberikan hasil uji potensi antibakteri yang negatif terhadap bakteri penguji *E. coli* dan *B. subtilis*. Metabolit sekunder sebagai agen antimikroba memiliki toksisitas yang berbeda-beda terhadap beberapa jenis bakteri tertentu [11]. Hasil uji antibakteri metabolit sekunder dari dGae-3 dan dYTae-14 negatif terhadap *B.subtilis* dan *E.coli* tetapi dimungkinkan masih banyak jenis bakteri patogen lain yang bisa dihambat pertumbuhannya.

Uji enzim ekstraseluler

Hasil yang didapatkan dari masing-masing strain *Geobacillus sp.* menunjukkan aktivitas negatif xilanase. Aktivitas negatif xilanase juga ditemukan pada *Geobacillus toebii subsp* [12]. Demikian pula didapatkan hasil aktivitas selulase yang negatif dari masing-masing strain *Geobacillus sp.*, yaitu ditandai dengan tidak terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

4. Kesimpulan

Masing-masing isolat *Geobacillus sp.* memiliki hubungan kekerabatan yang dekat satu sama lain dan memiliki hubungan kekerabatan dengan bakteri *Bacillus caldodenax* strain BCRC 11956, *Geobacillus kaustophilus subsp. Vulgivagus* strain CDZ 1 dan *Geobacillus thermoleovorans sp.* Metabolit sekunder dari isolat *Geobacillus sp.* dYTae-14 dan dGae-3 tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Kedelapan isolat *Geobacillus sp.* tidak memiliki enzim ekstraseluler xilanase dan selulase.

5. Daftar Pustaka

[1] Z. Elnasser, A. Maraqa, W. Owais, A. Khraisat, Isolation and Characterization of New Thermophilic Bacteria in Jordan, *The Internet Journal of Microbiology*, 3, 2, (2006)
 [2] T N Nazina, T P Tourova, A B Poltarau, E V Novikova, A A Grigoryan, A E Ivanova, A M Lysenko, V V Petrunyaka, G A Osipov, S S Belyaev, M V Ivanov,

- Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2, (2001) 433-446 <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-2-433>
- [3] Tairo Oshima, Kazutomo Imahori, Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24, 1, (1974) 102-112 <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-24-1-102>
- [4] Michel Blanc, Laurent Marilley, Trello Beffa, Michel Aragno, Notes: Rapid Identification of Heterotrophic, Thermophilic, Spore-Forming Bacteria Isolated from Hot Composts, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 4, (1997) 1246-1248 <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-4-1246>
- [5] Vinay V. Narayan, Mohamed A. Hatha, Hugh W. Morgan, Dhana Rao, Isolation and Characterization of Aerobic Thermophilic Bacteria from the Savusavu Hot Springs in Fiji, *Microbes and Environments*, 23, 4, (2008) 350-352 <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME08105>
- [6] Rudolf Ladenstein, Garabed Antranikian, Proteins from hyperthermophiles: Stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water, in: G. Antranikian (Ed.) *Biotechnology of Extremophiles*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1998, pp. 37-85.
- [7] Julian Davies, Vera Webb, 8 Antibiotic resistance in bacteria, in: R.M. Krause (Ed.) *Biomedical Research Reports*, Academic Press, 1998, pp. 239-273.
- [8] A. Kademi, N. Ait-Abdelkader, L. Fakhreddine, J. Baratti, Purification and characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophile *Bacillus circulans*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 2, (2000) 173-179 <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000353>
- [9] Agustina L. N. Aminin, F. Madayanti, P. Aditiawati, Akhmaloka, Isolation of Thermophiles From Gedongsongo Hot Spring Using A Simple Enrichment Medium, in: *International Seminar Advance in Biological Science*, 2007.
- [10] H Zhang, S Hanada, T Shigematsu, K Shibuya, Y Kamagata, T Kanagawa, R Kurane, *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2, (2000) 743-749 <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-2-743>
- [11] Syed Aun Muhammad, Safia Ahmad, Abdul Hameed, Antibiotic Production By Thermophilic *Bacillus* Specie SAT-4, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22, 3, (2009)
- [12] Annarita Poli, Ida Romano, Gaetano Caliendo, Giancarlo Nicolaus, Pierangelo Orlando, Antonio de Falco, Licia Lama, Agata Gambacorta, Barbara
- Nicolaus, *Geobacillus toebii* subsp. *decanicus* subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 52, 4, (2006) 223-234 <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.52.223>