

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN FUNDAMENTAL



**IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK TERMOFILIK DARI PERAIRAN
HIDROTERMAL PANTAI MOINIT, SULAWESI UTARA**

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Ir. Elvy Like Ginting, MSi, PhD (NIDN: 0011016802)
Kurniati Kemer, S.IK, MSi (NIDN: 0031108002)

UNIVERSITAS SAM RATULANGI

November 2016

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : IDENTIFIKASI BAKTERI PROTEOLITIK
TERMOFILIK DARI PERAIRAN HIDROTHERMAL
PANTAI MOINIT, SULAWESI UTARA

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Ir. ELVY LIKE GINTING M.Si, Ph.D
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
NIDN : 0011016802
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Ilmu Kelautan
Nomor HP : 0852 4125 3745
Alamat surel (e-mail) : elvy_like@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : KURNIATI KEMER S.IK, M.Si
NIDN : 0031108002
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
Institusi Mitra (jika ada) : -
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 100.000.000,00

Mengetahui,
Dekan FPIK Unsrat

(Prof. Dr. Ir. Grevo S. Gerung, MSc)
NIP/NIK 196503181990031002

Manado, 19 - 11 - 2016
Ketua,



(Ir. ELVY LIKE GINTING M.Si, Ph.D)
NIP/NIK 196801111991032001

Menyetujui,
Ketua LPPM Unsrat

(Prof. Dr. Ir. Inneke F.M. Rumengan, MSc.)
NIP/NIK 195711051984032001

RINGKASAN

Bakteri termofilik memiliki daya tarik karena kemampuannya menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas seperti protease. Sulawesi Utara memiliki beberapa sistem hidrotermal perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik dengan keragamannya. Salah satu sistem hidrotermal perairan laut tersebut adalah perairan pantai Moinit. Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat.

Penelitian ini merupakan langkah awal yakni mengidentifikasi bakteri termofilik penghasil protease, baik secara mikrobiologi maupun molekular, yang merupakan target khusus penelitian ini. Tujuan jangka panjang hasil penelitian ini sangat berguna dalam penggunaan dan pengembangan pemanfaatan bakteri termofilik maupun enzim protease tahan panas yang dihasilkan.

Bakteri termofilik diisolasi dari perairan hidrotermal Moinit dan dibawa ke laboratorium Bioteknologi Kelautan Unsrat untuk pengujian lanjutan. Pertama-tama bakteri termofilik diseleksi kemampuannya menghasilkan enzim protease dengan menumbuhkannya di medium yang mengandung pati. Kemampuannya menghasilkan amilase diamati lewat hidolisis protein yang ditunjukkan lewat pembentukan zona bening di sekitar koloni. Lebih lanjut diuji temperature tertinggi untuk bakteri tersebut dapat menghidrolisis protein. Selanjutnya bakteri termofilik proteolitik diidentifikasi secara mikrobiologi dengan pengamatan karakteristik morfologi dan fisiologi serta uji biokimia berdasarkan Bergey's manual. Agar bakteri dapat teridentifikasi dengan sempurna, dilaksanakan identifikasi molekular lewat amplikasi gen 16S rRNA menggunakan PCR dimana isolasi genomik dilakukan dengan kit isolasi genomik DNA. Hasil amplifikasi dideteksi menggunakan elektroforesis. Urutan DNA nukleotida dari produk hasil amplifikasi akan disekuens sebagai acuan dasar identifikasi spesies dan dibandingkan dengan sekuen data base *European Bioinformatics Institute* (EBI) BLASTIN 2.0 atau FASTA3 pada situs <http://www.ebi.ac.uk>. Untuk melihat hubungan kekerabatan tiap-tiap isolat dengan beberapa bakteri yang mempunyai kesamaan gen 16S rRNA 99% akan dilakukan pensejajaran secara on line melalui <http://expasy.org/tools/>

Hasil sementara yang diperoleh, 20 isolat bakteri termofil dari perairan hidrotermal pantai Moinit yang tumbuh pada suhu 45°C dengan karakteristik morfologi yang berbeda. 16 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik pada suhu 45°C. 11 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik pada suhu 55°C dengan isolate 2b memiliki indeks proteolitik terbesar. Lebih lanjut hanya 7 isolate bakteri yang mampu menghidrolisis protein pada suhu 65°C. Isolat bakteri proteolitik termofilik tersebut bersifat gram positif dan gram negative berbentuk batang dan bulat. Berdasarkan karakteristik morfologi dan uji biokimia, berpedoman pada buku identifikasi Bergey's Manual, isolate 2a, 2b, 3b, 4b, 9a, 12L, 16a teridentifikasi masuk dalam genus *Bacillus*, isolate 4a, 4b dan 16b masuk dalam genus *Streptococcus*, isolate 9c, 11a dan 11b i masuk dalam genus *Thermotoga* sp. sedangkan isolate 3a dan 9b masuk dalam genus *Pseudomonas* sp.

Kata kunci : Bakteri termofilik, proteolitik, identifikasi, mikrobiologi

PRAKATA

Bakteri termofilik merupakan sumber bagi enzim industri termostabil. Eksplorasi bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Salah satunya adalah bakteri proteolitik termofilik yang menghasilkan enzim protease yang stabil terhadap panas dan mampu mengkatalis reaksi kimia dengan cepat pada suhu tinggi. Sulawesi Utara memiliki beberapa perairan hidrotermal laut, salah satunya adalah pantai Moinit. Penelitian tentang bakteri proteolitik termofilik dari perairan pantai Moinit perlu dilaksanakan sebagai langkah awal dalam pemanfaatan enzim termostabil yang dihasilkan.

Perguruan tinggi merupakan wadah untuk melaksanakan penelitian ini. Dan lewat pendanaan penelitian Dasar/Fundamental, penelitian dapat terlaksanakan. Oleh sebab itu, peneliti menyampaikan banyak terima kasih atas dukungan dan bantuan yang telah diberikan oleh;

1. Kementerian Riset, Teknologi dan Perguruan Tinggi
2. Universitas Sam Ratulangi
3. Pemerintah Kabupaten Minahasa Selatan dalam hal ini desa Moinit.
4. Kepala Laboratorium Biologi Molekular dan Farmasitika.

Kiranya lewat penelitian ini, informasi ilmiah yang diperoleh tentang bakteri proteolitik termofilik perairan hidrotermal Moinit dapat menjadi acuan dalam pemanfaatan enzim termostabil yang dihasilkan.

Manado, November 2016.

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB. 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	2
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1. Pengambilan sampel	4
4.2. Kultur bakteri	5
4.3. Penentuan bakteri proteolitik termofilik	5
4.4. Penentuan kondisi optimum produksi protease	6
4.5. Identifikasi bakteri secara mikrobiologi	6
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	
5.1. Hasil	6
5.2. Luaran yang dicapai	17
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	
6.1. Identifikasi molekular	17
6.1.1. Isolasi DNA bakteri	17
6.1.2. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR	17
6.1.3. Elektroforesis	17
6.1.4. Sekuensing	18
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan	18
7.2. Saran	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	22

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 1. Themus Medium Modified (TMM)	5
Tabel 2. Morfologi Isolat Bakteri Termofilik	8
Tabel 3a. Index Proteolitik pada suhu 45°C pada masa inkubasi 12 jam	10
Tabel 3b. Index Proteolitik pada suhu 45°C pada masa inkubasi 24 jam	10
Tabel 4a. Index Proteolitik pada suhu 55°C pada masa inkubasi 24 jam	11
Tabel 4b. Index Proteolitik pada suhu 55°C pada masa inkubasi 48 jam	12
Tabel 5. Hasil Uji Biokimia	16

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel	5
Gambar 2. Pertumbuhan Bakteri Termofilik	7
Gambar 3. Aktivitas Proteolitik	9
Gambar 4a. Negative Rod (2b)	13
Gambar 4b. Positive Coccus (4a)	14
Gambar 4c. Positive Rod (16a)	15

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1. Foto Pelaksanaan Penelitian	22
Lampiran 2. Luaran Penelitian	26

BAB 1. PENDAHULUAN

Bakteri tersebar luas di alam dan berada dalam populasi yang besar dan beragam. Penyebarannya sampai pada tempat-tempat dengan kondisi ekstrim seperti pH, salinitas dan suhu lingkungan yang tinggi atau rendah (Ambramowicz, 1990). Bakteri yang mampu bertahan hidup pada kondisi lingkungan bersuhu tinggi dikenal sebagai bakteri termofilik. Suatu daya tarik tersendiri dari bakteri ini adalah kemampuannya untuk menghasilkan enzim yang stabil terhadap panas dan bahkan enzim yang dihasilkannya mampu mengkatalis reaksi kimia dengan cepat pada suhu tinggi (Friedman *dkk*, 1992).

Penggunaan bakteri termofilik dalam proses fermentasi industri (Van de Burg, 2003) memberikan beberapa keuntungan seperti pendinginan fermenter yang tidak diperlukan sehingga biaya fermentasi lebih rendah, banyak enzim yang disekresikan dan viskositas kaldu kultur bakteri yang rendah. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofilik yang bersifat stabilitas terhadap panas adalah protease. Enzim ini bermanfaat untuk menghidrolisis protein. Enzim protease dapat dimanfaatkan diberbagai bidang seperti di bidang pertanian, industri, farmasi, makanan, kosmetik dan lingkungan.

Di perairan laut, bakteri termofilik dijumpai di sistem hidrotermal perairan dangkal dan di sumber air panas dasar laut. Beberapa hasil penelitian di perairan hidrothermal menunjukkan terdapat berbagai jenis bakteri termofilik diantaranya : *Thermus aquaticus*, *Bacillus caldolyticus* dan *Bacillus caldotenax* (Dwidjoseputro, 1990). Eksplorasi tentang bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal telah dilakukan dan akan terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Sulawesi Utara memiliki beberapa sistem hidrotermal perairan laut yang merupakan habitat bakteri termofilik dan mengandung bakteri termofilik yang beragam. Salah satu sistem hidrotermal perairan laut tersebut adalah perairan pantai Moinit. Penelitian ini ingin mengungkap bakteri termofilik, khususnya penghasil protease dari perairan tersebut. Langkah awal yang perlu dilakukan adalah mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik tersebut. Identifikasi dilaksanakan secara konvensional yakni secara mikrobiologi dan identifikasi molekular lewat 16S rRNA sequencing yang dapat mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk diidentifikasi dengan metode konvensional. Identifikasi molekular lewat 16S rRNA sequencing digunakan sebagai parameter sistematik molekular universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu 45 – 80 ° C, sedangkan bakteri hipertermofilik dapat hidup di atas 80°C. Kemampuan bakteri termofilik untuk hidup pada kisaran suhu yang tinggi umumnya disebabkan oleh enzim-enzimnya yang resisten atau stabil terhadap panas, baik enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme ataupun hidrolisis (Bergquist, *dkk.*,1987). Bakteri termofilik mengundang daya tarik untuk diaplikasikan dalam proses-proses industri fermentasi maupun dalam proses-proses bioteknologi lainnya. Khususnya enzim-enzim termofilik dikenal bersifat stabil panas dan mampu mengkatalisis berbagai reaksi dengan cepat pada suhu tinggi (Friedman 1992). Lacey (1990) berpendapat bahwa, pada industri fermentasi penggunaan bakteri termofilik sangat menguntungkan karena suhu yang tinggi meningkatnya laju difusi dan kelarutan substrat-substrat non-gas, sehingga meningkatkan efisiensi.

Salah satu enzim termofilik yang dihasilkan oleh bakteri termofilik adalah protease. Protease adalah enzim yang berperan dalam reaksi pemecahan protein. Enzim ini merupakan golongan hidrolase serta dihasilkan secara ekstraseluler oleh mikroorganisme dan mempunyai peranan yang penting dalam metabolisme sel dan keteraturan proses dalam sel (Ward, 1983). Dewasa ini protease telah dieksploitasi secara komersial untuk membantu pemecahan protein dalam berbagai proses industri. Protease merupakan salah satu kelompok yang paling penting dari enzim industri yang secara luas digunakan dalam industri makanan, farmasi, hidrolisis protein, deterjen, pembuatan keju, bir, fotografi, baking, industri kulit juga digunakan dalam makanan hewan dan manusia untuk membantu proses bantu pencernaan (Synowiecki, 2010; Dias *dkk.*, 2008). Sekitar 75% dari penjualan dunia aplikasi enzim dalam dunia industri adalah enzim hidrolitik, yang mana sekitar 60% adalah enzim proteolitik (Ningthoujam dan Kshetri, 2010; Rai *dkk.*, 2010).

Protease yang diproduksi secara komersial dari tanaman, hewan dan mikroba. Mikroorganisme menawarkan sumber yang menarik dari protease karena dapat diproduksi dalam jumlah besar dalam waktu singkat dengan menggunakan teknik fermentasi (Dabananda dan Kshetri, 2010). Selain itu, produk protein yang mereka hasilkan lebih stabil daripada yang dari tumbuhan dan hewan.

Bakteri termofilik telah menjadi sumber yang menarik untuk enzim industri termostabil (Van den Burg, 2003). Enzim termostabil menunjukkan tingkat yang lebih tinggi dari perlawanan terhadap protein denaturasi misalnya, deterjen, pH ekstrim dan pelarut organik bila

dibandingkan dengan enzim mesofilik analog. *Bacillus* sp merupakan bakteri proteolitik termofilik yang telah berhasil diidentifikasi, diisolasi dari hot spring of Tarabalo, Odisha, India (Panda *dkk*, 2012). Wilson dan Remigio (2012) telah berhasil mengkarakterisasi protease dari bakteri termofilik yang diisolasi dari hot spring, Zimbabwe.

Beberapa penelitian khususnya di Indonesia telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik seperti dari sumber air panas Plantungan Kendal (2009) dan Gunung Merapi (2012). Eksplorasi tentang bakteri termofilik dari berbagai sumber hidrotermal akan terus dilakukan, mengingat permintaan akan enzim ini terus meningkat. Sulawesi Utara memiliki beberapa perairan hidrotermal laut seperti perairan Likupang dan Moinit. Berdasarkan road map penelitian yang telah dilaksanakan, peneliti berhasil mengisolasi bakteri termofilik dari perairan hidrotermal pantai Moinit, Sulawesi Utara (2009). Bakteri tersebut dapat tumbuh pada suhu $> 60^{\circ}\text{C}$. Oleh sebab itu, peneliti ingin mengidentifikasi kemampuan bakteri termofilik tersebut dalam menghasilkan protease, mengidentifikasi jenis bakteri proteolitik termofilik tersebut guna memperoleh isolat murni bakteri proteolitik termofilik yang teridentifikasi dengan baik.

Hal yang diamati dalam mengidentifikasi bakteri adalah karakteristik pertumbuhan, morfologi serta aktivitas biokimia berdasarkan produk akhir dari proses metabolisme. Metabolisme yang terjadi pada bakteri yaitu fermentasi, respirasi aerobik dan respirasi anaerobik (Schelegel, 1993). Produk-produk akhir dari metabolisme ini digunakan untuk mengidentifikasi atau menentukan karakteristik biokimia bakteri.

Selain itu metode yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah menggunakan teknik PCR. Teknik ini digunakan untuk menelaah profil DNA gen 16S-rRNA (Wang *dkk*, 2009). 16S rRNA sequencing sangat berguna dalam mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk diidentifikasi dengan metode konvensional (Mignard and Flandrois, 2006). 16S-rRNA digunakan sebagai parameter sistematik molekuler universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik yang diisolasi dari perairan hidrotermal pantai Moinit, Sulawesi Utara. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk :

1. Pemilahan bakteri proteolitik termofilik dan penentuan suhu optimum aktivitas protease termofilik.

2. Mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik dari perairan hidrotermal pantai Moinit secara mikrobiologi dengan menentukan karakteristik mikroskopik dan pengujian aktivitas biokimia.
2. Mengidentifikasi bakteri proteolitik termofilik dari perairan hidrotermal pantai Moinit secara molekular.
4. Mendapatkan isolat murni bakteri proteolitik termofilik.
5. Mengidentifikasi dan menentukan posisi filogen molekuler spesies bakteri proteolitik termofilik.

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam pengembangan pemanfaatan protease termofilik dari bakteri yang diisolasi dari perairan pantai Moinit sebagai informasi substansi unggul. Hasil penelitian ini akan dipublikasikan pada jurnal nasional yang terakreditasi dan akan dibukukan dalam bentuk bahan ajar MK. Mikrobiologi laut bagi mahasiswa.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap;

Tahap I diawali dengan pengambilan sampel air dan sedimen di perairan hidrotermal pantai Moinit sampai dengan Identifikasi morfologi bakteri proteolitik termofilik. Adapun tahapan penelitian pada tahap ini adalah :

4.1. Pengambilan sampel

Sampel air laut dan sedimen diambil pada beberapa titik sesuai dengan keberadaan sumber air panas di perairan hidrotermal pantai Moinit Sulawesi Utara (Gambar 1). Sampel air laut dan sedimen diambil langsung dengan botol-botol steril yang sudah disiapkan kemudian diberi label, dan dibawa ke Laboratorium Biologi Molekular dan Farmasetika, Universitas Sam Ratulangi untuk isolasi bakteri dan pengujian lebih lanjut. Saat pengambilan sampel, diukur parameter fisika kimia titik pengambilan sampel seperti suhu, salinitas dan pH.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel

4.2. Kultur bakteri

Media kultur bakteri yang digunakan adalah Nutrien broth serta Thermus Medium Modified (TMM). Adapun komposisi media cair TMM adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Thermus Medium Modified (TMM)

No	Komponen	Jumlah (%)
1	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.01
2	K ₂ HPO ₄	0.1
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.35
4	NaCl	0.1
5	Yeast Extract	0.05
6	Peptone	0.05

4.3. Penentuan bakteri termofilik penghasil protease

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam 5 ml media cair LB/TMM dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 – 48 jam. 0,1 ml biakan yang tumbuh disebarkan pada media padat TMM/NA dengan menggunakan L – glass dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada media padat ditotol ke media padat TMM/LA yang mengandung skim milk sebanyak 0,2% dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan protease ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni biakan tersebut. Dengan adanya zona bening berarti adanya hidrolisis protein oleh protease dari bakteri tersebut. Hal ini diekspresikan sebagai

Indeks Proteolitik (IP) yang didefinisikan sebagai rasio antara diameter zona bening di sekitar koloni dan diameter koloni (Freddy, *dkk*, 1999).

4.4. Penentuan kondisi optimum produksi protease

Isolat bakteri yang positif menghasilkan protease masing-masing diinokulasi ke dalam media TMMA yang mengandung skim milk 2 % dengan menggunakan kertas cakram. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara ditotol di bagian tengah kertas cakram. Masing-masing isolat diinokulasi dalam 4 media kultur. Setiap media kultur masing-masing isolat diinkubasi pada suhu berbeda yakni 45, 55 dan 65°C. Diukur IP yang terbentuk untuk setiap isolat untuk menentukan suhu optimum aktivitas protease.

4.5. Identifikasi bakteri secara mikrobiologi

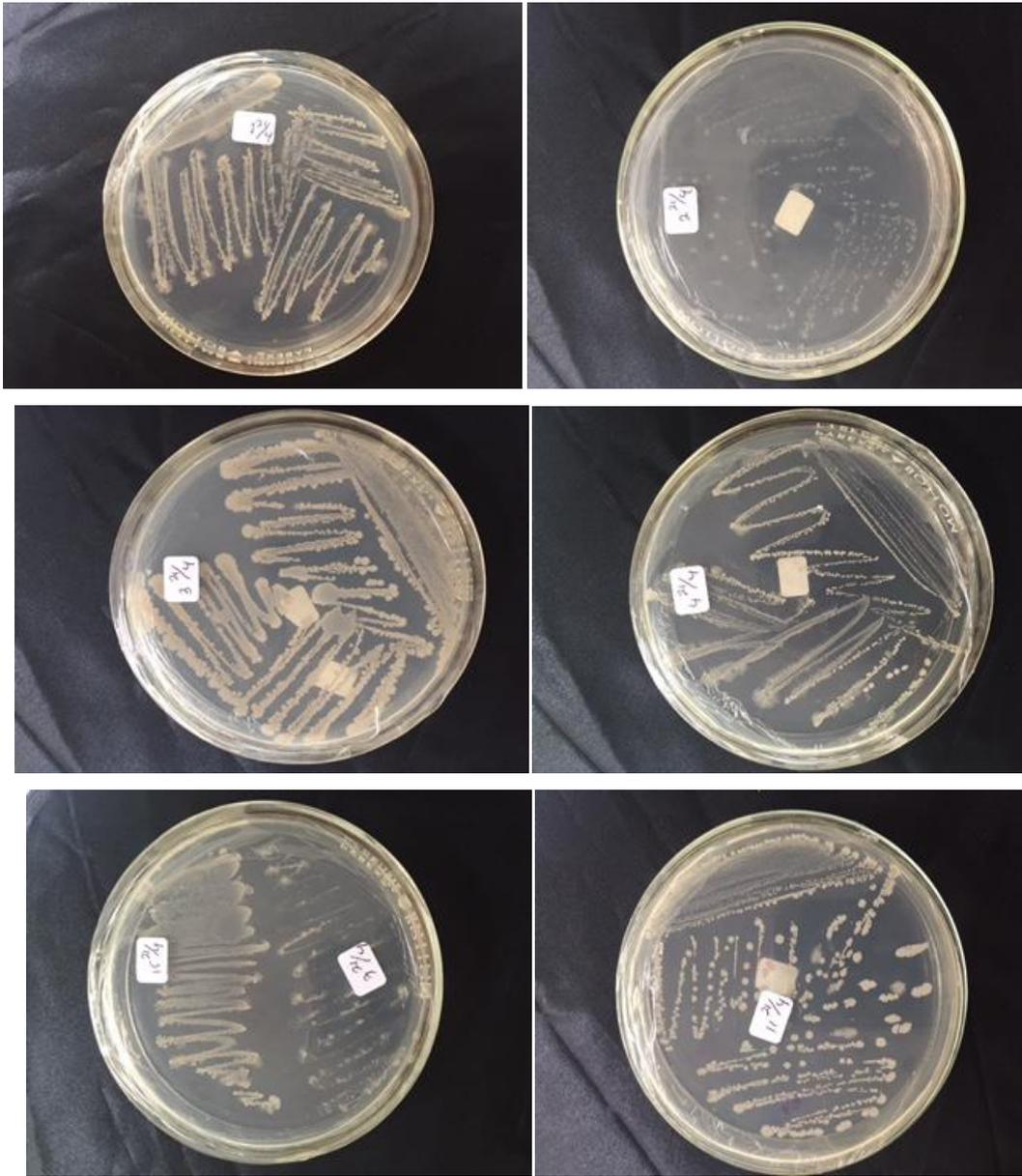
Langkah awal dalam mengidentifikasi bakteri adalah penentuan karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri. Karakteristik morfologi bakteri dapat dilakukan pada beberapa bentuk media pertumbuhan antara lain yaitu media nutrisi agar, *deep agar (agar tegak)* dan *slant agar (agar miring)*. Karakteristik morfologi yang diamati dari beberapa bentuk media pertumbuhan meliputi: bentuk koloni, warna, tepian, elevasi, topografi, tipe dan bentuk pertumbuhan. Selain itu penentuan bentuk, ukuran dan warna sel diamati sebagai hasil yang ditimbulkan sebagai akibat pewarnaan Gram. Uji fisiologi dilakukan untuk menentukan ada tidaknya pergerakan (motilitas) bakteri menggunakan media semi padat.

Bakteri proteolitik termofilik yang telah diisolasi berdasarkan morfologi dan fisiologi selanjutnya diidentifikasi. Pertama-tama setiap isolat diuji aktivitas biokimia berdasarkan Bergey's manual. Pengujian aktivitas biokimia bakteri pada tahap ini dilakukan dengan menggunakan beberapa uji yaitu : (1). Uji fermentasi karbohidrat, (2). Uji indol, (3). Uji methyl red, dan (4). Pewarnaan Gram, (5). Uji Voges – Proskauer, (6). Uji sitrat, (7). Uji katalase, (8). Uji produksi H₂S

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

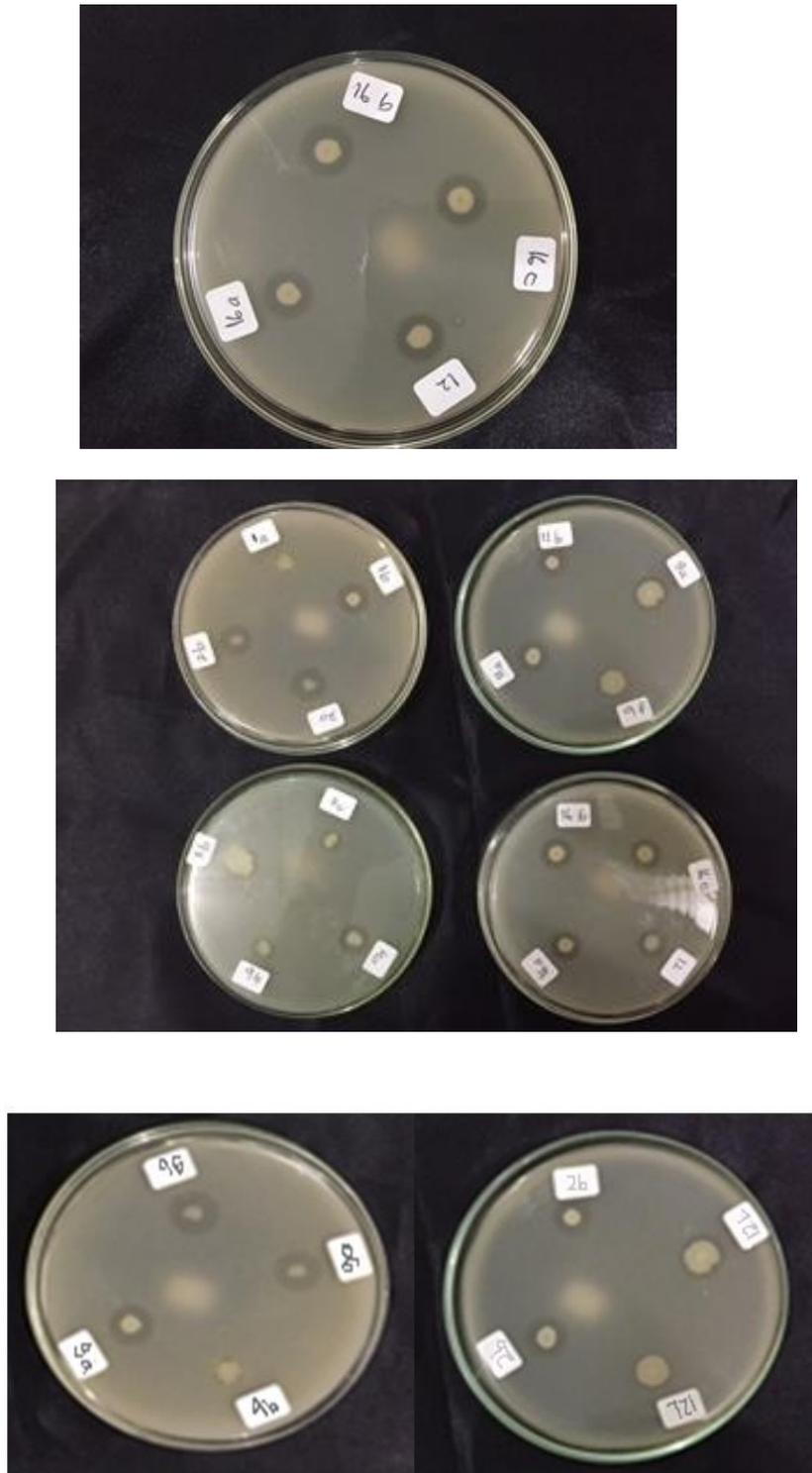
Penelitian ini berhasil mengisolasi 20 isolat bakteri termofil dari perairan hidrotermal pantai Moinit (Gambar 2) yang tumbuh pada suhu 45°C dengan karakteristik morfologi yang berbeda (Tabel 2). Kemampuan bakteri menghidrolisis protein, ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni yang tumbuh saat bakteri tersebut ditumbuhkan pada medium yang mengandung protein (Gambar 3).



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri termofilik

Tabel 2. Morfologi Isolat bakteri termofilik

No.	Kode isolat	Bentuk Koloni	Warna	Tepian	Pinggiran
1.	1a	Bulat sangat kecil	Coklat muda kekuningan	Agak cembung	Smoth
2.	1b	Bulat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
3.	2a	Bulat kecil	Coklat muda	Datar	Smoth
4.	2b	Bulat	Coklat muda	Datar	Tidak Beraturan
5.	3a	Bulat kecil	Coklat susu	Cembung	Bergerigi
6.	3b	Bulat	Coklat susu	Cembung	Smoth
7.	4a	Bukat kecil	Coklat muda kekuningan	Datar	Smoth
8.	4b	Bukat	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
9.	7	Bulat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
10.	8	Bulat sangat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
11.	9a	Bulat	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
12.	9b	Bulat	Coklat muda kekuningan	Datar	Bergerigi
13.	11a	Bulat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Bergerigi
14.	11b	Bulat	Coklat muda kekuningan	Datar	Smoth
15.	12	Bulat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
16.	13	Bulat kecil	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
17.	14	Bulat	Coklat muda kekuningan	Cembung	Smoth
18.	16a	Bulat kecil	Kuning muda susu	Cembung	Smoth
19.	16b	Bulat	Kuning muda susu	Cembung	Bergerigi
20.	16c	Bulat	Kuning muda susu	Cembung	Smoth



Gambar 3. Aktivitas Proteolitik

Dari hasil penapisan bakteri termofilik yang dapat menghidrolisis protein pada suhu 45°C selama masa inkubasi 12 jam, diperoleh 16 isolat bakteri, sedangkan yang mampu mendegradasi protease pada suhu 45°C selama masa inkubasi 24 jam diperoleh 15 isolat bakteri (Tabel 3). Isolat dengan kode 2b memiliki indeks proteolitik terbesar yakni 3.00 selama masa

inkubasi 12-24 jam. Keadaan ini mengindikasikan bahwa isolate bakteri ini memiliki kemampuan yang paling baik dalam menghidrolisis protein.

Tabel 3a. Index Proteolitik pada suhu 45°C pada masa inkubasi 12 jam

No.	Kode Isolat	Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	Index Proteolitik
1	1a	0.8	1	1.25
2	1b	0.5	1.1	2.20
3	2a	0.5	1.3	2.60
4	2b	0.4	1.2	3.00
5	3a	0.5	0.8	1.60
6	3b	1	1.2	1.20
7	4a	0.5	1.1	2.20
8	4b	0.5	0.8	1.60
9	9a	1	1.3	1.30
10	9b	1	1.1	1.10
11	11a	0.7	1.3	1.86
12	11b	0.5	1.1	2.20
13	12L	0.6	1	1.67
14	16a	0.6	1.2	2.00
15	16b	0.8	1.3	1.63
16	16c	0.8	1.2	1.50

Tabel 3b. Index Proteolitik pada suhu 45°C pada masa inkubasi 24 jam

No.	Kode Isolat	Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	Index Proteolitik
1	1a	1.4	1.9	1.36
2	1b	1	2.2	2.20
3	2a	0.7	1,9	2,71
4	2b	0.8	2.2	2.85
5	3a	1.4	1.6	1.14
6	3b	-	-	-
7	4a	1.1	2.3	2.09
8	4b	1.2	2	1.67
9	9a	2.3	2.7	1.17
10	9b	2.3	2.7	1.17
11	11a	1.1	2.4	2.18
12	11b	0.9	2.2	2.44
13	12L	1.1	2.2	2.00
14	16a	1.1	2.2	2.00
15	16b	0.9	2.4	2.67
16	16c	1	2.3	2.30

Kemampuan bakteri termofilik yang diperoleh dalam menghidrolisis protein pada suhu 55°C pada masa inkubasi 24 jam, diperoleh 6 isolat bakteri. Sedangkan selama masa inkubasi 48 jam meningkat menjadi 11 isolat bakteri dengan indeks proteolitik tertinggi adalah isolat bakteri 2b (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa isolate bakteri termofilik membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama dengan meningkatnya suhu untuk menghidrolisis protein.

Indeks proteolitik isolate bakteri 2a dan 3a lebih besar (>) dari 5 menunjukkan bahwa isolate bakteri tersebut memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menghasilkan esim protease. Jani *et al.*, 2016 menyatakan bahwa berdasarkan indeks proteolitik, organism dapat dikategorikan dalam tiga grup dalam menghasilkan enzim protease yakni sangat baik (PI>5), baik (PI>2.0 to, 5.0) dan tidak baik (PI<2).

Indeks proteolitik dalam media cawan agar dapat digunakan untuk menggambarkan kemampuan menghasilkan enzim protease (Lakshmi *et al.*, 2014). Akan tetapi indeks proteolitik hanya menggambarkan kemampuan menghasilkan enzim protease tapi tidak bisa digunakan untuk menentukan besar kemampuan dalam menghasilkan esnim protease (Ningthoujam & Kshetri (2010) dan Zilda *et al* (2012)). Indeks proteolitik mengindikasikan kemampuan relative dalam mengasilkan esnim protease.

Tabel 4a. Index Proteolitik pada suhu 55°C pada masa inkubasi 24 jam

No.	Kode Isolat	Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	Index Proteolitik
1	1a	-	-	-
2	1b	-	-	-
3	2a	0.1	0.1	1.00
4	2b	0.1	0.4	4.00
5	3a	0.1	0.1	1.00
6	3b	-	-	-
7	4a	-	-	-
8	4b	-	-	-
9	9a	0.7	1.1	1.57
10	9b	0.6	0.8	1.33
11	11a	-	-	-
12	11b	-	-	-
13	12	-	-	-
14	16a	0.5	1	2.00
15	16b	-	-	-
16	16c	-	-	-

Tabel 4b. Index Proteolitik pada suhu 55°C pada masa inkubasi 48 jam

No.	Kode Isolat	Diameter Koloni	Diameter Zona Bening	Index Proteolitik
1	1a	-	-	-
2	1b	-	-	-
3	2a	0.1	0.1	1.00
4	2b	0.2	1.2	3,97
5	3a	0.2	0.2	1.00
6	3b	-	-	-
7	4a	0.1	0.1	1.00
8	4b	0.1	0.3	3.00
9	9a	0.9	1.3	1.44
10	9b	0.9	1.1	1.22
11	11a	-	-	-
12	11b	-	-	-
13	12L	0.1	0.3	3.00
14	16a	0.4	0.4	0.10
15	16b	0.1	0.1	1.00
16	16c	0.1	0.1	1.00

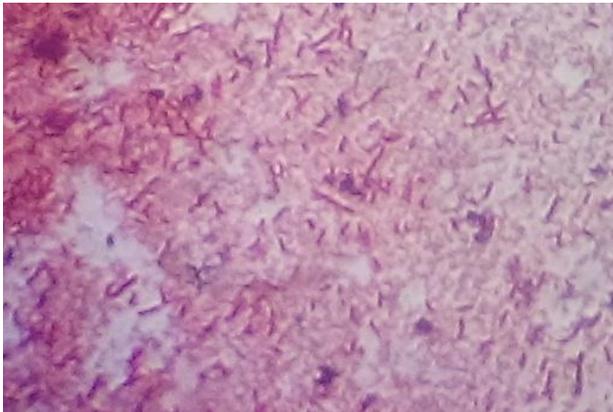
Pada suhu 65°C, isolate bakteri 2b, 4b, 9a, 9b dan 12L mampu menghidrolisis protein dengan IP tertinggi. Hasil ini menunjukkan bahwa isolate tersebut sangat baik untuk dimanfaatkan dalam menghasilkan enzim tahan panas dan dapat digunakan dalam industry maupun proses bioteknologi lainnya.

Berdasarkan hasil pewarnaan gram dari setiap bakteri yang mampu menghidrolisis protein terlihat bahwa bakteri termofilik tersebut bersifat Gram positif dan gram negative. Bentuk dari bakteri termofilik yang dihasilkan berbentuk batang dan bulat (Gambar 4). Isolate bakteri proteolitik termofilik lebih lanjut diuji secara biokimia. Hasil dari beberapa uji yang telah dilaksanakan terlihat pada tabel di bawah ini.

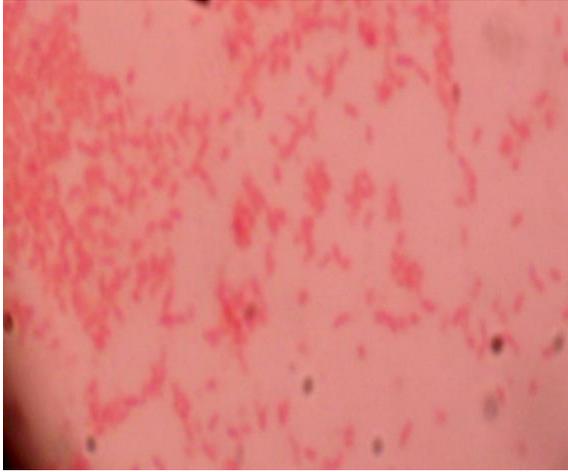
Hasil uji biokimia menunjukkan perbedaan dari beberapa isolate yang mengindikasikan perbedaan karakter fisiologis. Perbedaan ini menunjukkan adanya perbedaan genus/spesies dari setiap isolate. Berdasarkan buku identifikasi Bergey's Manual, isolate 2a, 3b, 4b, 12, 16a dan 16c teridentifikasi masuk dalam genus *Bacillus*, isolate 4a, 4b dan 16b teridentifikasi masuk dalam genus *Streptococcus*, sedangkan isolate 2b, 3a dan 9b teridentifikasi masuk dalam genus *Thermotoga* sp. Pathak and Rathod (2014) berhasil mengidentifikasi *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* dan *Staphylococcus thermophilus* dari hot water spring yang mana isote bakteri ini mampu menghasilkan enzim hidrolitik.

Thermotoga sp. merupakan bakteri termofilik ($T_{opt} \geq 70 \text{ } ^\circ \text{C}$) yang telah dipelajari secara ekstensif sebagai wawasan dasar bagi kehidupan pada suhu tinggi dan bermanfaat dalam bidang bioteknologi (Frock, *et al.*, 2010). Hal ini disebabkan karena *Thermotoga* sp. dapat menghasilkan enzim tahan panas seperti selulase (Xu *et al.*, 2015) dan protease (Ward, *et al.*, 2002). *Thermotoga* sp. telah berhasil diisolasi dari berbagai habitat hydrothermal seperti dasar laut Ribeira Quente, the Azores (Swithers, *et al.*, 2011).

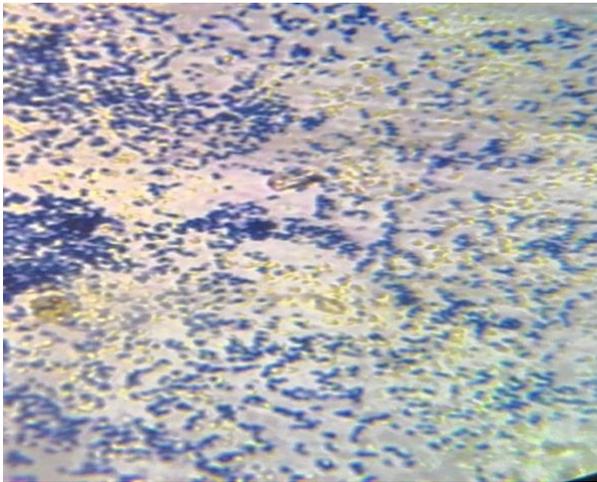
Isolat-isolat bakteri yang berhasil diisolasi ini telah berhasil diidentifikasi secara morfologi dan biokimia. Akan tetapi, agar isolate-isolat bakteri ini dapat teridentifikasi secara sempurna sampai ke tingkat strain bakteri, perlu diuji lebih lanjut lewat identifikasi molekuler. Oleh sebab itu, uji molekuler setiap isolate ini rencana akan dilakukan untuk tahun berikutnya.



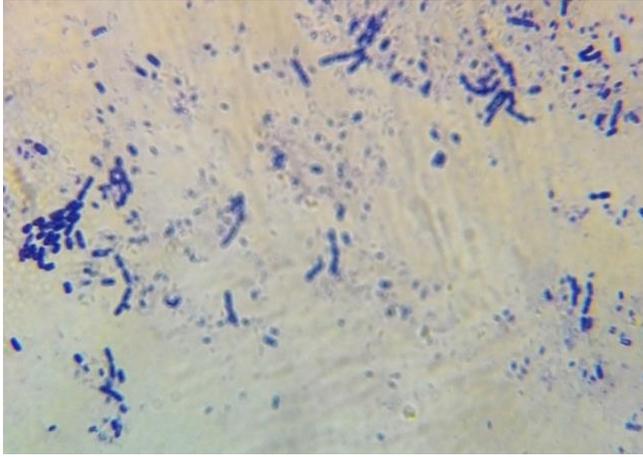
Gambar 4a. Negative Rod (3a)



Negative Rod (9b)



Gambar 4b. Positive Coccus (16b)



Gambar 4c. Positive Rod (16a).

Tabel 5. Hasil Uji Biokimia

Isolat	Uji Morfologi		Uji Biokimia												
	Bentuk	Gram	Motil	Indol	Katalase	Fermentasi Karbohidrat			Lac	Fruk	Lysin	MR	V.P	H ₂ S	Citrat
						Gas	Glu	Suk							
2a	Bacil	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
4b	Bacil	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
12L	Bacil	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
16b	Cocos	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
16c	Bacil	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
2b	Bacil	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
3a	Bacil	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
4a	Coccus	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
9a	Bacil	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
9b	Bacil	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
16a	Bacil	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

5.2. Luaran yang dicapai

1. Isolat bakteri termofilik penghasil protease tahan panas dengan karakteristik morfologinya.
2. Hasil yang diseminarkan pada 1st International Seminar on Tropical Aquatic Resources Science and Management
3. Draft jurnal yang akan dipublikasi pada jurnal nasional terakreditasi setelah dilengkapi dengan data identifikasi molekular pada tahap selanjutnya.
4. Draft bahan ajar dalam MK. Mikrobiologi Laut

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Tahap 2. (Untuk tahun kedua). Agar bakteri proteolitik termofilik yang diisolasi dari perairan hidrotermal Moinit dapat teridentifikasi dengan sempurna maka pada tahap ini akan dilaksanakan identifikasi molekular dengan tahapan sebagai berikut:

6.1. Identifikasi molekular

6.1.1. Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA terhadap setiap isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi secara mikroskopik dan biokimia dilakukan dengan menggunakan Innuprep DNA mini kit (Biometra). Larutan DNA genom disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya digunakan pada tahap amplifikasi gen 16SrRNA.

6.1.2. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'TACCTTGTTACGACTT-3') (Marchesi *dkk.* 1998). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 94 °C, 2 menit; tahap denaturasi 92 °C, 30 detik; tahap annealing 55 °C, 30 detik, tahap elongasi 72 °C selama 1 menit. Proses PCR terdiri dari 30 siklus. Selanjutnya *post* PCR pada suhu 75 °C selama 20 menit dan tahap *stop* PCR pada suhu 4 °C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis.

6.1.3. Elektroforesis

Gel elektroforesis disiapkan dengan 0,8 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x tris-asetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Tris-basa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Pada waktu

elektroforesis diberikan suatu marker atau penanda molekul DNA. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 30-40 Volt dan 28 – 29 mA dan diakhiri setelah bromofenol sampai tepi bawah gel (Aris, *dkk*, 2013). Hasil elektroforesis kemudian didokumentasi.

6.1.4. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dikirim ke laboratorium pelayanan analisis gen DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen data base *European Bioinformatics Institute* (EBI) BLASTIN 2.0 atau FASTA3 pada situs <http://www.ebi.ac.uk>. Selanjutnya untuk melihat hubungan kekerabatan tiap-tiap isolat dengan beberapa bakteri yang mempunyai kesamaan gen 16S rRNA 99%, maka dilakukan pensejajaran secara on line melalui <http://expasy.org/tools/>.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari penelitian tahap 1 ini diperoleh:

- 20 isolat bakteri termofil dari perairan hidrotermal pantai Moinit yang tumbuh pada suhu 45°C dengan karakteristik morfologi yang berbeda.
- 15 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik pada suhu 45°C dengan isolate 2a memiliki indeks proteolitik terbesar.
- 11 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik pada suhu 55°C dengan isolate 3b memiliki indeks proteolitik terbesar.
- Hanya dua isolate bakteri yang mampu menghidrolisis pati pada suhu 65°C
- Isolat bakteri yang mampu menghidrolisis protein bersifat Gram positif dan gram negative berbentuk batang dan bulat

Berdasarkan karakteristik morfologi dan uji biokimia dan dengan berpedoman buku identifikasi Bergey's Manual, isolate isolate 2a, 2b, 3b, 4b, 9a, 12L, 16a teridentifikasi masuk dalam genus *Bacillus*, isolate 4a, 4b dan 16b masuk dalam genus *Streptococcus*, isolate 9c, 11a dan 11b dalam genus *Thermotoga* sp. sedangkan isolate 3a dan 9b teridentifikasi masuk dalam genus *Pseudomonas* sp.

7.2. Saran

-Penelitian tahap kedua penting untuk dilanjutkan agar bakteri termofilik proteolitik yang sangat potensial dari perairan hidrotermal pantai Moinit dapat teridentifikasi sempurna.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambramowicz, D., 1990. Biocatalysis. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Aris, M., Sukerda, E. Haris, M.H. Sukasi dan M. Yuhana. 2013. Identifikasi molecular bakteri pathogen dan disain primer PCR. *Budidaya perairan*. 1(3):43-50.
- Bergey, D.H., John, G.H., Noel, R.K., and H.A. Peter. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed), Lippincott Williams and Wilkins.
- Berquist, P.L., D.R. Love, J.M. Croft, M.B. Streiff, R.M. Daniel dan W.H. Morgan, 1997. Genetic dan Potensial Biotechnological Applications of Thermophilic Microorganisms. *Biotechnol. Genet. Engineer. Rev.* 5:199-235. Intercept Ltd., Wimborne.
- Cappucino, J.G. dan Sherman, 1992. *Microbiology, A Laboratory Manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. New York. 462 hal.
- Dabananda, S.N. dan P. Kshetri P. 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 10:5126-5134.
- Dias, D.R, Vilela, D.M, Silvestre, M.P.C dan R. F. Schwan. 2008. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:2027-2034.
- Dwidjoseputro, D., 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerbit Djambatan Jakarta.
- Friedman, S. M., 1992. Thermophilic Microorganisms. *Encyclop. Microbial.* 4: 217-229. Academic Press, Inc, New York.
- Frock, A.D., Notey, J.S., and R.M. Kelly. 2010. The genus *Thermotoga*: Recent developments. *Environ Technol.*, 31(10): 1169–1181.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley dan S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. Ed ke-9. Baltimore : William and Wilkins.
- Kristen S. S., DiPippo, J.I., Bruce, D.C., Detter, C., Tapia, R., Han, S., Saunders, E., Goodwin, L.A., Han, J., Woyke, T., Pitluck, S., Pennacchio, L., Nolan, M., Mikhailova, N., Lykidis, A., Land, M.L., Brettin, T., Stetter, K.O., Nelson, K.E., J. Peter Gogarten, J.P. and K.M. Noll. 2011. Genome Sequence of *Thermotoga* sp. Strain RQ2, a Hyperthermophilic Bacterium Isolated from a Geothermally Heated Region of the Seafloor near Ribeira Quente, the Azores. *Journal of Bacteriology*, 193: 20, 5869–5870.
- Lacey, J., 1990. Isolation of Thermophilic Microorganisms. *Isolation of Biotechnological Organisms From Nature*. McGraw-hill Publishing Company, New York. 115p.

- Lakshmi, B.K.M., Ratnasri, P.V., Devi, K.A., and K.P.J.Hemalatha. 2014. Screening, Optimization of Producing and Partial Characterization of Alkaline Protease from Haloalkaliphilic *Bacillus sp.* IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology, 3:2, 435-443.
- Marchesi, J.R, T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom dan W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ. Microbiol 64:795-9.
- Mignard S dan J.P.Flandrois. 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. J Microbiol Methods, 67: 574–581.
- Ninghoujam, D.S. dan P. Kshetri. 2010. A thermostable alkaline protease from a moderately halo-alkalithermotolerant *Bacillus subtilis* strain SH1. Australian J. Basic Appl. Sci. 4:5126-5134.
- Panda, M.K., Sahu, M.K dan K. Tayung. 2012. Isolation and characterization of a Thermophilic *Bacillus sp.* With protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. Iranian Journal of Microbiol. 5(2): 159-165.
- Pathak, A.P. and Rathod, M.G.,. 2014. Cultivable bacterial diversity of terrestrial thermal spring of Unkeshwar, India. J Biochem, 5:4, 814-818.
- Rai, S.K, Roy, J.K dan A.K. Mukherjee. 2010. Characterization of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis sp.* Nov. AS-S24-II. Appl. Micrbiol. Biotechnol. 85:1437-1450.
- Schelegel, S.G., 1993. General Microbiology. Crambridge University Press. Great Britain. 688p.
- Synowiecki, J. 2010. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. Afr. J. Biotechnol. 9: 7020-7025.
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as source for novel enzymes. Curr. Opin. Microbiol. 6: 213-218.
- Ward, O. P. 1983. Proteinase. *Di dalam* Microbial Enzyme And Biotechnology. W. M. Fogarty. Applied Science Publisher. New York.
- Ward, D.E., Shockley, K.R., Chang, L.S., Levy, R.D., Michel, J.K., Connnersi, S.B. and R.M. Kellhy, 2002. Proteolysis in Hyperthermophilic Microorganisms. Archaea 1, 63–74.
- Wang, Z.Y., S.R. Shi, M.J. Xu dan H.M. Yang. 2009. 16sRNA-basil analysis of bacterial diversity in the microbial flora of the goose intestinal treat. Journal of animal and feed sciences. 18:531-540.

- Wilson, P. dan Z. Remigio. 2012. Production and characterisation of protease enzyme produced by a novel moderate thermophilic bacterium (EP1001) isolated from an alkaline hot spring, Zimbabwe. *African Journal of Microbiology Research*. 6(27):5542-5551.
- Xu, H., Han, D. and Z. Xu, 2015. Expression of Heterologous Cellulases in *Thermotoga* sp. Strain RQ2. *BioMed Research International*, Vol. 2015, 11 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/304523>
- Zilda, D.S., Harmayani, E., Widada, J., Asmara, W., Irianto, H.E., Patantis, G. and Y. N. Fawzya. 2012. Screening of Thermostable Protease Producing Microorganisms Isolated From Indonesia Hot spring. *Squalen*, 7:3, 105-114.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto pelaksanaan penelitian



Sampling



Sampel





Media dan kultur bakteri



Isolasi bakteri



Uji Indol



Uji Metil Red



Uji Motilitas



1. PENDAHULUAN

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran sel. Organisme ini termasuk dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik), namun memiliki peran besar dalam kehidupan di bumi. Pada umumnya bakteri berukuran 0,5 -5 μm , tetapi ada bakteri ada bakteri tertentu yang dapat berdiameter hingga 700 μm tergantung pada jenisnya (Anonymous, 2015).

Jumlah bakteri di bumi sangat banyak jika dibandingkan dengan jumlah makhluk hidup lain. Karena jumlahnya yang banyak sehingga bakteri dapat di temukan di hampir semua tempat, baik di tanah, air maupun udara, bahkan di dalam tubuh dan manusia yang bersimbiosis dengan organisme lain maupun sebagai agen parasit atau biasa dikenal dengan bakteri patogen (Anonymous, 2015). Salah satu tempat hidup bagi bakteri adalah laut. Bakteri dapat ditemukan mulai dari permukaan hingga dasar laut. Salah satu bakteri yang hidup di laut adalah bakteri termofilik.

Bakteri termofilik merupakan jenis bakteri yang hidup pada tempat dengan suhu yang tinggi. Bakteri ini biasanya hidup pada daerah geothermal seperti di kawah gunung berapi, sumber air panas, geysir, fumarol, serta tempat bersuhu tinggi lainnya. Di laut bakteri ini biasanya ditemukan di sumber air panas laut dan di kawah gunung berapi dasar laut. Bakteri ini hidup di dasar tiga samudera yaitu Atlantik, Indian, Pasifik, karena terdapat gunung berapi yang termasuk pada bagian topografi dasar laut (Austin, 1993).

Bakteri termofilik menghasilkan enzim termostabil yang bersifat resisten atau stabil terhadap panas. Karena sifatnya yang resisten maka enzim ini banyak dimanfaatkan dalam proses industri baik industri tekstil, industri makanan maupun industri farmasi serta bioteknologi, seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnostik (enzim yang memproses DNA dan RNA) dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengelolaan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik (Vielle dan Zeikus, 2008 dalam Pujawati, 2012).

Saat ini perkembangan bioteknologi molekuler cukup pesat. Perkembangan ilmu serta pengetahuan dalam biologi molekuler, khususnya pada pengkajian karakter bahan genetik telah menghasilkan kemajuan yang sangat pesat bagi perkembangan untuk mengetahui jenis suatu organisme dan manfaatnya bagi umat manusia (Suryanto, 2003). Salah satu organisme yang

bisa dikaji dalam skala molekuler adalah bakteri termofilik. Dengan keunggulan-keunggulan bakteri termofilik serta perkembangan bioteknologi molekuler yang cukup pesat, maka makalah ini disusun untuk mengkaji aspek molekuler dari bakteri termofilik.

2. BAKTERI TERMOFILIK

2.1 Pembagian Bakteri

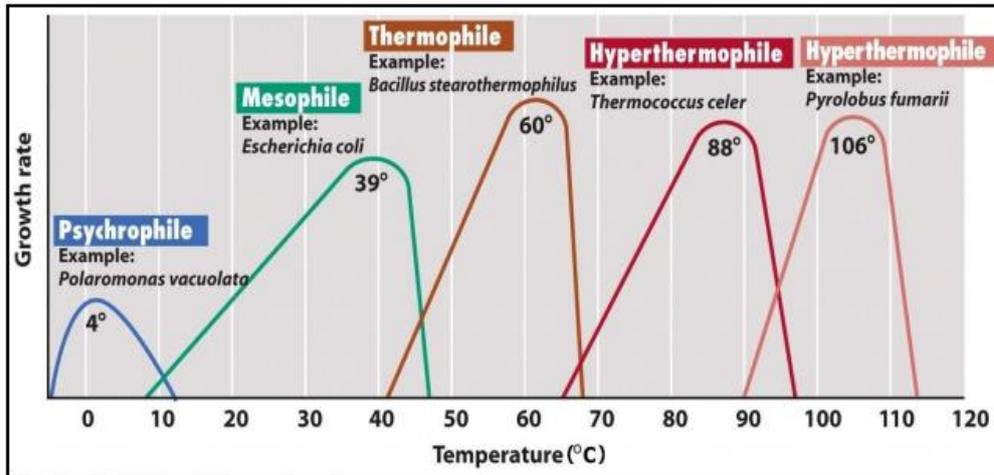
Suhu merupakan salah satu variabel yang paling penting dalam lingkungan. Klasifikasi organisme hidup sering berhubungan dengan suhu karena selalu dianggap sebagai salah satu elemen yang paling dasar dari sistematis biologis (Kristjansson, 1992).

Berdasarkan suhu optimum pertumbuhan, mikroorganisme secara umum dibedakan atas lima, yaitu (Prescott 2008) :

- Bakteri psikrofil, bakteri ini tumbuh dengan baik pada suhu 0 - 15°C.
- Bakteri psikotrop, bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 0 - 35°C.
- Bakteri mesofil merupakan organisme yang memiliki pertumbuhan optimal pada suhu 20 - 45°C.
- Bakteri termofil, bakteri ini mampu tumbuh pada suhu 45 - 65°C.
- Bakteri hipertermofil merupakan bakteri yang dapat tumbuh pada suhu diatas 90°C dan maksimal 100°C, namun pada beberapa bakteri dapat hidup pada suhu 80 - 113°C.

Lebih lanjut Madigan (2012) membagi bakteri hipertermofil dalam dua kisaran suhu yakni;

- < 60°C - < 100°C, contohnya *Thermococcus celer*.
- 90°C - > 110°C contohnya *Pyrolobus fumarii* (Gambar 01).



Gambar 1. Hubungan Suhu dan Pertumbuhan pada Kelompok Mikroorganisme dengan Suhu yang Berbeda (Madigan, 2012).

Friedman (1992) membagi bakteri termofilik menjadi dua kelompok yaitu, kelompok bakteri termofilik fakultatif dan kelompok bakteri termofilik obligat. Bakteri termofilik fakultatif adalah kelompok bakteri yang mempunyai kemampuan untuk hidup pada suhu maksimum antara 50 - 60°C dan dapat hidup pada suhu dibawah 30°C, sedangkan bakteri termofilik obligat adalah kelompok bakteri kelompok bakteri termofilik yang memiliki kemampuan hidup pada suhu optimum 65 - 70°C dan tidak mampu hidup pada suhu dibawah 42°C.

Kristjansson, (1992) menyatakan bahwa organisme dengan pertumbuhan suhu yang lebih besar dari 50°C disebut termofilik. Definisi dari batas suhu termofilik didasarkan pada dua argumen utama. Pertama, suhu dibawah batas ini merupakan suhu yang umum di alam tetapi suhu yang lebih tinggi terkait erat dengan aktivitas panas bumi atau dalam suatu situasi khusus. Kedua, tidak ada eukariot yang telah diketahui dapat tumbuh di atas batas ini.

Lebedinsky (2007) membagi organisme termofilik menjadi dua domain filogenetik yang berbeda yaitu bacteria dan archaea. Bakteri termofilik akan hidup dominan pada habitat dengan kisaran suhu 50 - 90°C. Sebagian besar archaea termofilik merupakan hipertermofilik yang memiliki suhu optimum pertumbuhan diatas 80 - 100°C, namun ada archaea yang mampu hidup di atas titik didih yaitu 121°C (Prescott, 2008).

Bakteri termofilik sejati adalah bakteri yang tumbuh pada suhu diatas suhu maksimum untuk sebagian besar bakteri, terutama bentuk-bentuk patogen. Suhu maksimum untuk bakteri patogen adalah sekitar 37,5°C - 45 ° C. Pada suhu dibawah 40°C - 45° C bakteri termofilik tidak dapat bertumbuh, jika ada maka pertumbuhannya sangat lemah.

Untuk bertumbuh dengan baik bakteri termofilik membutuhkan suhu diatas 50°C bahkan ada beberapa diantaranya yang mampu bertumbuh pada suhu 80°C. Sebagian besar bakteri termofilik mengalami pertumbuhan yang melimpah pada suhu 60°C - 70°C (Bergey, 1919).

2.2 Habitat Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik merupakan bakteri yang memiliki habitat dengan kondisi panas. Mereka hidup dan berkembang biak dalam suhu ekstrim, yaitu 45°C hingga 80°C. Bahkan ada bakteri termofilik yang bereproduksi pada suhu 121°C. Bakteri ini diberi nama *Strain 121*. Suhu 121°C lebih panas daripada suhu air mendidih.

Tidak banyak tempat di muka bumi yang mampu menyediakan habitat ekstrim bagi bakteri termofilik. Bakteri termofilik umumnya mendiami berbagai habitat geotermal baik di darat maupun di laut (Blochl, 1995). Daerah geotermal biasanya dihubungkan dengan aktivitas tektonik dimana lempeng bumi bergerak menjauh atau bertabrakan satu sama lain. Daerah ini ditandai dengan aktivitas gunung berapi dan tempat panas bumi yang ada di permukaan (Kristjansoon, 1991) seperti kawah gunung berapi, sumber air panas, geyser dan fumarol (Blochl, 1995), bahkan ada yang ditemukan dalam lumpur panas yang berada di permukaan bumi, seperti yang telah diisolasi dari lumpur Lapindo di Jawa (Habibie *dkk*, 2014). Di Indonesia bakteri termofilik telah berhasil diisolasi di berbagai tempat seperti sumber air panas Gonoharjo di Jawa (Mulyani dan Aminin, 2004), Sumber air panas sungai Medang di Jambi (Sari *dkk.*, 2012), sumber air panas danau Ranau di Sumatera Selatan (Muharni, 2009), gunung merapi di Yogyakarta (Kurniawati, 2012) dan masih banyak tempat lainnya.

Bakteri termofilik juga telah ditemukan dalam lingkungan termal buatan seperti pemanas air. Pemanas air rumah tangga atau industri memiliki suhu 60-80°C dan oleh karena itu merupakan habitat yang menguntungkan bagi pertumbuhan bakteri ini. Organisme seperti *thermus aquaticus*, yang merupakan organisme termofilik mata air panas, telah diisolasi dari pemanas air rumah tangga dan industri. Organisme termofilik juga dapat tumbuh dalam pembangkit listrik elektik, debit air panas, dan sumber panas buatan. Selain itu bakteri termofilik ini mampu hidup pada tumpukan sampah-sampah yang membusuk yang telah menghasilkan panas yang cukup tinggi sebagai akibat metabolismenya (Volk dan Wheeler, 1998).

2.3 Karakteristik Bakteri Termofilik

Kristjansson, (1991) mengemukakan bahwa bakteri termofilik memiliki banyak perbedaan dengan bakteri mesofilik. Kemampuan bakteri termofilik untuk bertahan hidup pada suhu tinggi disebabkan oleh stabilitas enzim, membran sel, dan makromolekul sel yang telah teradaptasi. Bakteri termofilik memiliki enzim yang lebih tahan panas dan sistem sintesis protein yang berfungsi dengan baik pada suhu tinggi. Enzim yang dimiliki bakteri termofilik memiliki jumlah yang lebih besar. Protein yang terdapat pada sel memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan ionik yang sangat kuat. Komposisi membran selnya didominasi oleh asam lemak jenuh sehingga bersifat lebih stabil dan fungsional pada suhu tinggi. Hal ini disebabkan oleh kuatnya ikatan hidrofobik pada rantai asam lemak jenuh bila dibandingkan dengan asam lemak tak jenuh.

Kemampuan hidup dari suatu mikroorganisme termofilik berhubungan dengan struktur selnya yang memiliki kelebihan dalam beberapa hal, yaitu :

a. Struktur membran sel

Selain enzim dan makromolekul lain di dalam sel, membran sitoplasma dari bakteri termofilik tahan terhadap panas. Membran memiliki fungsi sebagai pembatas antara sitoplasma dan lingkungan ekstra seluler. Membran kedap untuk ion dan molekul kecil yang lain, dan karena tindakan protein transpor, membran sitoplasma mengontrol komposisi ionik dari sitoplasma. Membran sitoplasma juga harus mempertahankan gradien proton dan potensial listrik di membran. Energi yang disimpan dalam gradien elektrokimia proton dapat digunakan untuk mendorong proses yang membutuhkan energi seperti transportasi substrat, motilitas dan sebagainya (Kathleen, 2008).

Madigan, *dkk* (2009) mengemukakan bahwa bakteri termofilik memiliki lipid kaya asam lemak jenuh. Struktur ini memungkinkan membran untuk tetap stabil dan fungsional pada suhu tinggi. Asam lemak jenuh membentuk lingkungan hidrofobik yang lebih kuat daripada asam lemak tak jenuh, sehingga memungkinkan membran lebih stabil. Archaea yang mayoritas hipertermofil mempunyai ikatan eter pada lipid di dinding sel.

b. Struktur Sel Protein

Enzim dan protein lain pada bakteri termofilik lebih tahan panas dibanding yang terdapat pada mesofilik dan berfungsi optimal pada suhu tinggi. Studi beberapa enzim termostabil menunjukkan bahwa enzim-enzim tersebut sedikit berbeda dalam urutan asam amino, menjadi bentuk sensitif terhadap panas pada enzim yang mengkatalisis reaksi yang sama seperti pada mesofilik. Protein yang tahan panas pada bakteri termofilik didukung oleh peningkatan jumlah ikatan ion antara asam amino basa dan asam, dan seringkali struktur dalamnya sangat

hidrofobik, dimana struktur inti yang hidrofobik ini menurunkan kemungkinan rusaknya ikatan ionik pada struktur protein, dan protein pada organisme termofilik mempunyai ketahanan alami dalam cairan sitoplasma (Madigan *dkk.*, 2009).

Chaperonin merupakan jenis protein yang sangat jarang dijumpai pada protein-protein fungsional lainnya di dalam sel. Protein ini berperan dalam mempertahankan kembali struktur tiga dimensi dari protein fungsional sel dari denaturasi suhu lingkungan yang bersifat ekstrim. Enzim dan protein lain pada bakteri termofilik lebih tahan panas dibanding yang terdapat pada mesofilik dan berfungsi optimal pada suhu tinggi. Protein ini memiliki struktur yang tetap stabil, tahan terhadap denaturasi dan proteolisis sehingga dapat membantu organisme termofilik mengembalikan fungsi aktifitas enzimnya bila terdenaturasi oleh suhu yang tinggi. Chaperonin tersusun oleh molekul yang disebut chaperone, yang membentuk struktur chaperonin seperti tumpukan kue donat pada sebuah drum. Tiap cincin donat terdiri atas 7, 8 atau 9 subunit chaperone tergantung jenis organismenya. Dalam aktivitasnya mempertahankan struktur protein fungsional agar tetap stabil, chaperonin membutuhkan molekul ATP (Dessy, 2008).

c. Struktur DNA

Protein unik ditemukan pada organisme termofilik yang menyebabkan DNA tidak terdenaturasi pada organisme ini. Semua bakteri termofilik menghasilkan topoisomerase DNA yang disebut DNA gyrase. DNA gyrase ini memberikan supercoil positif ke dalam DNA, sehingga menstabilkan DNA terhadap panas dan dengan demikian mencegah denaturasi DNA heliks (Madigan *dkk.*, 2008). DNA girase merupakan salah satu anggota kelompok enzim topoisomerase yang berperan dalam mengontrol topologi DNA suatu sel dan memegang peran penting dalam proses replikasi dalam transkripsi DNA. Semua jenis topoisomerase dapat merelaksasikan DNA tetapi hanya DNA girase yang dapat mempertahankan struktur DNA tetapi berbentuk supercoil. DNA girase disusun oleh 90-150 pasangan basa-N DNA. DNA girase ini juga selalu dijumpai pada organisme yang hidup di lingkungan diatas suhu 70°C dan juga dapat dijumpai pada organisme yang hidup pada kisaran suhu sekitar 60°C DNA ini merupakan salah satu kelengkapan sel dari organisme termofil (Dessy, 2008).

3. ASPEK MOLEKULER BAKTERI TERMOFILIK

3.1 Identifikasi Bakteri Termofilik Secara Molekuler

Habibie *dkk*, (2014) mengemukakan bahwa dalam mengidentifikasi bakteri langkah awal yang dilakukan adalah dengan menumbuhkan isolat bakteri pada media yang sesuai untuk kemudian diamati. Isolat bakteri dapat dibedakan secara morfologi, mikroskopis, dan biokimia. Pengamatan morfologi meliputi bentuk, tepian dan warna pada koloni. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram untuk mengetahui jenis Gram dan dan pewarnaan endospora untuk mengetahui keberadaan endospora pada isolat. Uji biokimia sederhana meliputi uji katalase, uji sitrat, uji MR (Methyl Red), uji VP (VogesProskauer), uji indol, dan uji ornithine. Hasil yang diperoleh kemudian diidentifikasi secara konvensional berdasarkan Bergey's Manual of Determinative Bakteriology (Murhani, 2009).

Akan tetapi ada bakteri yang sulit diidentifikasi secara konvensional (Mignard dan Flandrous, 2006). Identifikasi secara molekuler akan lebih mudah untuk mengetahui jenis bakteri yang sulit di identifikasi secara konvensional. Alat yang digunakan untuk proses identifikasi menggunakan 16S rDNA antara lain dry bath (Thermo Scientific Multiblok Heater), NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer), Polymerase Chain Reaction (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700), 96-well sequencer (Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer), perangkat elektroforesis dan visualisasi dengan Gel-Doc XR 1000 (Habibie *dkk*, 2014). Ada beberapa tahapan dalam melakukan identifikasi secara molekuler yaitu (Fatmawali, 2013) :

a. Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA terhadap setiap isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi secara mikroskopik dan biokimia dilakukan dengan menggunakan kit isolasi DNA (Contohnya innuprep DNA). Larutan DNA genom disimpan pada suhu tertentu untuk selanjutnya digunakan pada tahap amplifikasi gen 16S rRNA.

b. Amplifikasi gen 16S rRNA dengan teknik PCR

Templat yang digunakan untuk amplifikasi gen 16SrRNA bisa dari primer universal untuk domain bakteri yang berupa forward primer dan reverse primer maupun DNA genomik dari koloni bakteri yang akan diidentifikasi. Contohnya primer universal 8F (forward; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (reverse; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

c. Elektroforesis dan Visualisasi

DNA yang telah diamplifikasi, dipisahkan dengan menggunakan elektroforesis gel yang telah disediakan, selanjutnya dilakukan visualisasi menggunakan pewarna etidium bromida dan dideteksi dengan sinar UV pada UV transiluminator. Hasil elektroforesis kemudian didokumentasikan.

d. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Untuk mengetahui urutan basa DNA-nya. Hasil sekuens kemudian dibandingkan dengan data gen bank menggunakan program BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotida) dari NCBI (National Center for Biotechnology Information) untuk mengetahui kemiripan spesies dari isolat bakteri yang diuji.

3.2 Pemanfaatan Biomolekul Bakteri Termofilik

Dewasa ini bakteri termofilik menjadi primadona dalam dunia industri maupun dunia ilmu pengetahuan. Aspek molekuler yang menyebabkan bakteri termofilik menjadi primadona adalah senyawa biomolekul yang ada dalam organisme termofilik. Sama seperti organisme lainnya, bakteri termofilik memiliki senyawa – senyawa organik sederhana pembentuk organisme hidup dan bersifat khas sebagai produk aktifitas biologis yang disebut dengan biomolekul (Anonymous, 2014).

Senyawa biomolekul biasanya dikenal dengan empat bentuk yaitu protein, asam nukleat, karbohidrat dan lipid. Biomolekul memiliki fungsi tertentu di dalam sel, misalnya protein sebagai enzim, alat transpor, antibodi, hormon dan pembentuk membran. Karbohidrat sebagai sumber energi, komponen pembentuk membran dan dinding sel. Lipid sebagai sumber energi, hormon, dan pembentuk sel. Asam nukleat sebagai faktor genetika, koenzim, pembawa energi, dan pengatur biosintesis protein. Salah satu bentuk dari senyawa biomolekul yaitu protein khususnya enzim pada bakteri termofilik memiliki kelebihan tahan terhadap suhu panas yang membuat enzim dari bakteri ini banyak dimanfaatkan bagi kehidupan manusia.

Pada lingkungan yang ekstrim, bakteri termofilik dapat menghasilkan enzim dengan sifat tahan terhadap suhu tinggi yang dikenal sebagai enzim termostabil. Enzim termostabil ini sangat cocok untuk proses industri yang memerlukan suhu tinggi, karena itu enzim ini mulai mendapatkan perhatian besar. Ketahanannya terhadap suhu menyebabkan enzim termostabil memiliki nilai komersial yang sangat tinggi (Gerday *dkk.*, 2000 dalam Sari *dkk.*, 2012).

Ada berbagai jenis enzim yang dihasilkan dari bakteri termofilik. Beberapa diantaranya adalah sebagai berikut (Kim, 2013):

- **Protease**
Protease dikenal juga sebagai hidrolasepeptidil-peptida, merupakan sesuatu yang penting bagi industri, 60% dari penjualan enzim digunakan secara ekstensif dalam berbagai bidang industri, termasuk deterjen, mengempukkan daging, pembuatan keju, dan pembuatan bir. Penggunaan protein ini sebagai deterjen aditif merangsang pembangunan komersial dan menghasilkan perluasan pengetahuan tentang enzim ini. Protease alkali memiliki pemanfaatan substansial dalam sektor industri lainnya seperti kulit, tekstil, dan sintesis organik.
- **Selulase**
Selulase adalah nama bagi semua enzim yang memutuskan ikatan glikosidik beta-1,4 di dalam selulosa, sedodekstrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya. Selulosa merupakan sumber organik yang melimpah dari pakan, bahan bakar, dan bahan kimia yang terdiri dari β -1,4-glikosidik obligasi dalam mode linear. β -glikosidases yang berasal dari termofilik telah menjadi perhatian yang baru dalam bidang industri farmasi.
- **Kitinase**
Kitin adalah suatu polimer linear β -1, 4-linked larut dari N-asetilglukosamin (GlcNAc). Kitin merupakan polimer kedua tertinggi yang paling melimpah di alam. Kitinase yang diproduksi oleh banyak organisme seperti virus, bakteri aktinobakteri, tanaman, dan hewan.
- **Xilanase**
Xilan yang merupakan komponen yang mendominasi hemiselulosa adalah salah satu zat organik yang paling melimpah di bumi. Enzim Xilanase memiliki aplikasi besar dalam pulp dan industri kertas. Kayu yang digunakan untuk produksi pulp dirawat pada suhu tinggi dan pH dasar, yang berarti bahwa prosedur enzimatik membutuhkan protein yang menunjukkan termostabilitas tinggi dan aktivitas kisaran pH yang luas.

Selain menarik untuk aplikasi industri enzim dari bakteri termofilik ini juga penting dalam mengembangkan ilmu dasar, karena sifat enzim ini yang tahan panas sehingga memiliki potensial aplikasi yang tinggi. Penggunaan enzim termostabil dalam bidang biteknologi dapat menurunkan biaya operasi dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi.

Enzim termostabil biasanya digunakan untuk meneliti beberapa hal seperti evolusi enzim, mekanisme molekuler, termostabil protein dan batas suhu maksimum (Wiryawan, 2011 dalam Pujawati, 2012). Enzim termostabil merupakan kandidat yang menarik untuk bioteknologi dan aplikasi industri, seperti di teknik biologi molekuler untuk penelitian dan penggunaan diagnostik (enzim DNA dan RNA pengolahan) dan pati (pati - mengkonversi enzim), makanan, pengolahan limbah, sintesis organik, pembuatan kertas, dan industri kulit (Bin dkk, 2006).

Saat ini, beberapa bidang industri terutama pangan, deterjen, medis serta bidang penelitian mulai banyak tergantung dengan kebutuhan terhadap enzim-enzim termostabil (Mulyani dan Aminin, 2004). Hampir 70% sektor industri yang menggunakan enzim dalam prosesnya memanfaatkan enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil. Industri deterjen misalnya menggunakan protease yang bersifat tahan suasana alkalis, industri amilum menggunakan enzim amilase, amiloglukosidase dan glukoisomerase yang berasal dari mikroorganisme termofil.

Enzim termostabil yang dihasilkan mikroorganisme bermanfaat dan aplikasinya dalam bidang industri dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Enzim Hidrolitik yang Berasal dari Mikroorganisme dan Aplikasinya pada Bidang Industri. (Sutiamiharja, 2008).

Enzim	Sumber	Aplikasi	Industri
Amilase	Bakteri	Pelapis kertas	Pabrik kertas
	Bakteri	Bahan pencuci	Detergen
	Bakteri	Pembersihan warna kain	Kain
Protease	Bakteri	Penghilang noda	Detergen
	Bakteri	Aroma daging	Makanan daging
	Bakteri	Pembersih luka	Kesehatan
	Bakteri	Pembersih kain	Tekstil

Selain itu ada pula enzim yang digunakan dalam teknik PCR yaitu Enzim polimerase DNA yang berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Pada proses PCR enzim ini diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim polimerase DNA yang digunakan untuk proses PCR diisolasi dari bakteri termofilik atau hipertermofilik oleh karena itu enzim ini

bersifat termostabil sampai suhu 95 C. Aktivitas polimerase DNA bergantung dari jenisnya dan dari mana bakteri tersebut diisolasi. Sebagai contoh adalah enzim Pfu polimerase (diisolasi dari bakteri *Pyrococcus furiosus*) mempunyai aktivitas spesifik 10x lebih kuat dibandingkan aktivitas spesifik enzim Taq polimerase (diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*) (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. Metode identifikasi Bakteri termofilik penghasil protease

3.1. Pengambilan sampel

Sampel air laut dan sedimen diambil pada beberapa titik sesuai dengan keberadaan sumber air panas. Sampel air laut dan sedimen diambil langsung dengan botol-botol steril yang sudah disiapkan kemudian diberi label, dan dibawa ke Laboratorium untuk isolasi bakteri dan pengujian lebih lanjut. Saat pengambilan sampel, diukur parameter fisika kimia titik pengambilan sampel seperti suhu, salinitas dan pH.

3.2. Kultur bakteri

Media kultur bakteri termofilik adalah Luria bertani media serta *Thermus Medium Modified* (TMM). Adapun komposisi media cair TMM adalah sebagai berikut:

No	Komponen	Jumlah (%)
1	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.01
2	K ₂ HPO ₄	0.1
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.35
4	NaCl	0.1
5	Yeast Extract	0.05
6	Peptone	0.05

3.3. Penentuan bakteri termofilik penghasil protease

Isolat bakteri diinokulasi ke dalam 5 ml media cair LB/TMM dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 – 48 jam. 0,1 ml biakan yang tumbuh disebarkan pada media padat TMM/NA dengan menggunakan L – glass dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 – 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada media padat ditotol ke media padat TMM/LA yang mengandung skim milk sebanyak 0,2% dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan protease ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni biakan tersebut. Dengan adanya zona bening berarti adanya hidrolisis protein oleh protease dari bakteri tersebut. Hal ini diekspresikan sebagai

Indeks Proteolitik (IP) yang didefinisikan sebagai rasio antara diameter zona bening di sekitar koloni dan diameter koloni (Freddy, *dkk*, 1999).

3.4. Penentuan kondisi optimum produksi protease

Isolat bakteri yang positif menghasilkan protease masing-masing diinokulasi ke dalam media TMMA yang mengandung skim milk 2 % dengan menggunakan kertas cakram. Inokulasi bakteri dilakukan dengan cara ditotol di bagian tengah kertas cakram. Masing-masing isolat diinokulasi dalam 4 media kultur. Setiap media kultur masing-masing isolat diinkubasi pada suhu berbeda yakni 55, 60, 65 dan 70°C. Diukur IP yang terbentuk untuk setiap isolat untuk menentukan suhu optimum aktivitas protease.

3.5. Identifikasi bakteri secara mikrobiologi

Langkah awal dalam mengidentifikasi bakteri adalah penentuan karakteristik morfologi dan fisiologi bakteri. Karakteristik morfologi bakteri dapat dilakukan pada beberapa bentuk media pertumbuhan antara lain yaitu media nutrisi agar, *deep agar (agar tegak)* dan *slant agar (agar miring)*. Karakteristik morfologi yang diamati dari beberapa bentuk media pertumbuhan meliputi: bentuk koloni, warna, tepian, elevasi, topografi, tipe dan bentuk pertumbuhan. Selain itu penentuan bentuk, ukuran dan warna sel diamati sebagai hasil yang ditimbulkan sebagai akibat pewarnaan Gram. Uji fisiologi dilakukan untuk menentukan ada tidaknya pergerakan (motilitas) bakteri menggunakan media semi padat.

Bakteri proteolitik termofilik yang telah diisolasi berdasarkan morfologi dan fisiologi akan diidentifikasi. Pertama-tama setiap isolat akan diuji aktivitas biokimia berdasarkan Bergey's manual. Pengujian aktivitas biokimia bakteri dilakukan dengan menggunakan beberapa uji yaitu : (1). Uji fermentasi karbohidrat, (2). Uji indol, (3). Uji methyl red, (4). Uji Voges – Proskauer, (5). Uji sitrat, (6). Uji katalase, (7). Uji produksi H₂S dan pewarnaan spora (Cappucino dan Sherman,1992). Agar bakteri dapat teridentifikasi dengan sempurna maka pada tahap ini akan dilaksanakan identifikasi molekular dengan tahapan sebagai berikut:

3.6. Identifikasi molekular

3.6.1. Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA terhadap setiap isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi secara mikroskopik dan biokimia dilakukan dengan menggunakan Innuprep DNA mini kit (Biometra). Larutan DNA genom disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya digunakan pada tahap amplifikasi gen 16SrRNA.

3.6.2. Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR

Primer yang digunakan adalah primer universal untuk domain bakteri berupa forward primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') dan reverse primer 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi *dkk.* 1998). Semua komponen reaksi dicampur ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Tahapan PCR terdiri dari pre-denaturasi 94 °C, 2 menit; tahap denaturasi 92 °C, 30 detik; tahap annealing 55 °C, 30 detik, tahap elongasi 72 °C selama 1 menit. Proses PCR terdiri dari 30 siklus. Selanjutnya *post* PCR pada suhu 75 °C selama 20 menit dan tahap *stop* PCR pada suhu 4 °C. Hasil PCR disimpan pada suhu -20 °C atau langsung dielektroforesis.

3.6.3. Elektroforesis

Gel elektroforesis disiapkan dengan 0,8 % agarose dalam 1x buffer TAE (0,24 gr agarose dalam 30 ml 1xTAE) (50x tris-asetat EDTA (TAE):1 l dH₂O, 242 gr Tris-basa, 37,2 gr Na₂EDTA, 57,1 ml asam asetat glasial), dipanaskan dan setelah larut didinginkan sampai 50°C kemudian dituang pada cetakan gel. Wadah yang sudah berisi gel diberi buffer 1x TAE secukupnya kemudian memasukkan sampel hasil digesti pada sumur-sumur gel. Pada waktu elektroforesis diberikan suatu marker atau penanda molekul DNA. Elektroforesis dilakukan pada kondisi 30-40 Volt dan 28 – 29 mA dan diakhiri setelah bromofenol sampai tepi bawah gel (Aris, *dkk.* 2013). Hasil elektroforesis kemudian didokumentasi.

3.6.4. Sekuensing

Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Proses sekuensing dikirim ke laboratorium pelayanan analisis gen DNA. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen data base *European Bioinformatics Institute* (EBI) BLASTIN 2.0 atau FASTA3 pada situs <http://www.ebi.ac.uk>. Selanjutnya untuk melihat hubungan kekerabatan tiap-tiap isolat dengan beberapa bakteri yang mempunyai kesamaan gen 16S rRNA 99%, maka dilakukan pensejajaran secara on line melalui <http://expasy.org/tools/>.

4. PENUTUP

Bakteri termofilik adalah bakteri yang tumbuh pada suhu tinggi dengan kisaran suhu 45 – 65 °C, adapula yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 70 – 100 °C yang disebut bakteri hipertermofil. Secara umum bakteri termofilik terbagi atas dua kelompok yaitu, kelompok bakteri termofilik fakultatif dan kelompok bakteri termofilik obligat. Kelompok bakteri termofilik fakultatif adalah kelompok bakteri yang mampu hidup pada suhu maksimum antara

50 – 60 °C dan pada suhu dibawah 30°C, sedangkan bakteri termofilik obligat adalah kelompok bakteri termofilik yang mampu hidup pada suhu pada suhu maksimum 65 – 70 °C dan tidak mampu hidup pada suhu dibawah 42°C.

Bakteri termofilik umumnya mendiami daerah geotermal baik yang ada di darat maupun yang ada di laut. Bakteri ini biasanya terdapat di kawah gunung berapi, sumber air panas, geyser, cadangan minyak bumi dan batubara serta sistem hidrotermal perairan dangkal bahkan bakteri ini telah ditemukan dalam pemanas air dan tumpukan sampah yang telah membusuk.

Kemampuan bakteri ini untuk bertahan hidup pada suhu tinggi disebabkan oleh stabilitas enzim yang memiliki komposisi asam amino yang berbeda dengan bakteri pada umumnya, protein yang terdapat dalam sel bakteri ini memiliki ikatan hidrofobik dan ikatan ionik yang sangat kuat serta komposisi membran sel yang didominasi oleh asam lemak jenuh sehingga bersifat lebih stabil dan fungsional pada suhu tinggi.

Identifikasi molekuler bakteri dapat dilakukan dengan tahapan isolasi DNA bakteri, Amplifikasi gen 16S-rRNA dengan PCR, elektroforesis dan visualisasi kemudian sekuensing. Identifikasi secara molekuler sangat membantu untuk mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk diidentifikasi secara konvensional.

Bakteri termofilik mempunyai peran penting dalam pengembangan ilmu serta aplikasi industri. Bakteri ini menghasilkan enzim – enzim yang resisten terhadap panas yang banyak digunakan pada beberapa bidang industri serta penelitian.

Stabilitas enzim pada suhu tinggi menyebabkan bakteri ini mempunyai peran penting dalam pengembangan ilmu serta aplikasi industri. Enzim yang stabil pada suhu tinggi ini banyak digunakan pada beberapa bidang industri serta penelitian.

Dalam pemanfaatan bakteri termofilik, bakteri yang berpotensi tersebut perlu diidentifikasi. Identifikasi molekuler dengan menggunakan 16S

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 2015. <http://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri> (dikunjungi 12 maret 2015).
- Anonimous, 2014. <http://id.m.wikipedia.org/wiki/biomolekul> (dikunjungi 06 Maret 2015)
- Anonimous, 2013. <http://id.wikipedia.org/wiki/Selulase> (dikunjungi 25 Mei 2015)
- Austin, B. 1993. Marine Microbiology. Cambridge University.1993

- Bergey, D. H. 1919. *Thermophilic Bacteria*. Journal of bacteriology, vol. IV, No. 4. Laboratory of Hygiene, University of Pennsylvania.
- Dessy, S.C. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara*. Tesis. USU Repository. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara
- Fatimawali. 2013. *Identifikasi Mikrobiologi dan Analisis Gen 16S rRNA Bakteri Resisten Merkuri Isolat S3.2.2 yang Diperoleh dari Limbah Tambang Rakyat*. Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 2 No. 04.
- Friedman, S. M., 1992. *Thermophilic Microorganisms*. Academic Press Inc Encliep microbiol New York.
- Handoyo, D dan Rudiretna, A. 2001, Februari. *Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Unitas, Vol. 9, No. 1, Pusat Studi Bioteknologi – Universitas Surabaya.
- Kurniawati, D. H. 2012. *Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Isolasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi sebagai Penghasil Enzim Protease*. Skripsi, Dipublikasikan. FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Kim, S. 2013. *Marine Microbiology*. Wiley-VCH. Germany
- Kristjansson, J. K. 1991. *Thermophilic Bacteria*. CRC Press. Florida
- Lebedinsky, A.V. , Chernyh N. A., dan Bonch-Osmolovskaya E. A. 2007. *Phylogenetic Systematics of Microorganisms Inhabiting Thermal Environments*. Pleiades Publishing, Ltd. Published in Russian in Biokhimiya.
- Liu, B., Li, H., Wu, S., Zhang, X., dan Xie, L. 2006, Agustus. *A simple and Rapid Method for the Differentiation and Identification of Thermophilic Bacteria*. Canadian Journal of Microbiology, 753-757.
- Madigan, Marthinko, Stahl, Clark. 2012. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, Inc. San Francisco, CA 94111.
- Mulyani, N. S dan Aminin A. L. N , 2004. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Proteolitik dari Isolat Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gonoharjo dan Plantungan, Kendal Jawa Tengah*.
- Murhani. 2009, desember. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinasedari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan*. Jurnal Penelitian Sains. 09:12-15.
- Pujawati, S. 2012. *Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Isolasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi sebagai Penghasil Enzim Protease*. Skripsi, Dipublikasikan. FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Prescott, Herley, and Klein's.2008. *Microbiology seven edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York, NY 10020

- Ratulangi, F. R. 2006. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Protease dari Bakteri Termofilik Laut. Seminar, Tidak Dipublikasikan. FPIK Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Sari, U. M ., Agustien A., dan Nurmiati. 2012, Desember. Penapisan dan Karakterisasi Bakteri Selulolitik Termofilik Air Panas Sungai Medang, Kerinci, Jambi. Jurnal Biologi Universitas Andalas,1(2), 166-171.
- Suryanto, D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler. USU digital library. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Volk, W. A dan M. F. Wheeler. 1988. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.