Hayati, Maret 2002, hlm. 10-14
ISSN 0854-8587
Vol. 9, No. 1

Isolasi, Karakterisasi, dan Kloning Gen Penyandi α-Amilase Bakteri Halofil Moderat asal Bledug Kuwu

Isolation, Characterization, and Cloning of the α-Amylase Gene from Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Bledug Kuwu

ARTINI PANGASTUTI[1‡], DINAMELLA WAHJUNINGRUM[2], ANTONIUS SUWANTO[1,3,4*]

[1]*Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16144*
[2]*Jurusan Budi Daya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*
[3]*Pusat Penelitian Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*
[4]*Seameo-Biotrop, Jalan Raya Tajur, Ciawi, Bogor 16001*

Diterima 15 Agustus 2001/Disetujui 20 November 2001

A moderately halophilic bacteria, BK-05, was isolated from Bledug Kuwu, a saline terrestrial area at Central Java. Based on partial sequence of 16S-rRNA gene, the isolate was closely related to *Halobacillus litoralis*. This isolate showed amylolytic activity when grown on saline media [15% (w/v) NaCl] suplemented with starch. A pair of primer was designed based on the sequence of *amyH* gene from *Halomonas meridiana* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. PCR amplification using these primers showed three DNA bands with each size approximately 1.50, 1.00, and 0.75 kb. Partial DNA sequencing analysis based on its deduced protein sequence revealed that the 1.50 kb band was closely related to the sequence of metalloprotease from *Bacillus subtilis* (approximately 54.3% identity in 184 amino acid overlap). Southern hybridization analysis showed that the 1.50 kb fragment was located within a 4.0 kb fragment of *Bam*HI, 4.8 kb of *Eco*RI, 4.3 kb of *Hin*dIII, and 4.0 kb of *Xho*I digestion of BK-05 genomic DNA, respectively.

PENDAHULUAN

Kelompok mikroorganisme yang sanggup hidup pada kondisi lingkungan ekstrem dengan kadar garam tinggi ekstrem ialah mikroorganisme halofil. Mikroorganisme dominan yang hidup pada lingkungan ini ialah bakteri halofil moderat dan arkea (*archaea*) halofil ekstrem. Menurut Kushner (1985) halofil moderat adalah kelompok mikroorganisme yang tumbuh optimum pada kadar NaCl 0.5-2.5 M. Bakteri halofil moderat memiliki banyak potensi, yaitu dalam fermentasi makanan, penghasil senyawa osmoprotektan, enzim hidrolitik, polimer, dan degradasi senyawa toksik (Ventosa *et al.* 1998).

Bakteri halofil moderat memiliki habitat antara lain danau berkadar garam tinggi, kolam yang dibuat manusia di ladang pemanenan garam laut, tanah berkadar garam tinggi, dan makanan yang diasinkan. Salah satu daerah berkadar garam tinggi yang ada di Indonesia ialah Bledug Kuwu yang terletak di Desa Kuwu, Jawa Tengah. Daerah ini berupa kolam lumpur luas yang memiliki kadar garam lebih tinggi dari laut dan dimanfaatkan oleh penduduk setempat untuk ladang pemanenan garam. Keunikannya ialah di dalam kolam terjadi letupan lumpur secara periodik hingga dapat mencapai ketinggian beberapa meter dari permukaan kolam. Letupan tersebut dapat berbunyi seperti dentum meriam, mengeluarkan asap, gas, dan air garam. Dari Bledug Kuwu ini telah berhasil diisolasi beberapa isolat bakteri halofil moderat yang berdasarkan analisis gen 16S-rRNA berkerabat dekat dengan bakteri laut (Sipayung 1999).

Enzim α-amilase mengkatalisis hidrolisis ikatan 1,4 pati menghasilkan maltodekstrin linear pendek. Enzim ini digunakan secara luas dalam industri makanan dan deterjen. Penggunaan amilase dari bakteri halofil dapat memberikan keuntungan karena memiliki aktivitas optimum di kadar garam tinggi (Ventosa & Nieto 1995). Baru sedikit informasi yang ada mengenai amilase dari bakteri halofil. *Acinetobacter* sp. (Onishi & Hidaka 1978), *Nesterenkonia halobia* (Onishi & Sonoda 1979), *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* (Kobayashi *et al.* 1986), dan isolat *Micrococcus* spp. (Onishi 1972, Khire 1994) dilaporkan memiliki aktivitas amilolitik, tetapi tidak tersedia informasi mengenai karakteristik molekulernya. Satu-satunya bakteri halofil yang telah dikarakterisasi amilasenya secara molekuler ialah *Halomonas meridiana.* Hasil analisis protein dari gen penyandi amilasenya menunjukkan homologi yang cukup tinggi dengan amilase dari bakteri lain, *streptomycetes*, serangga, dan mamalia (Coronado *et al.* 2000).

Tujuan penelitian ini mengisolasi bakteri halofil moderat dari Bledug Kuwu, menapis isolat yang menghasilkan enzim α-amilase, mengkarakterisasi isolat dan mengklon gen penyandi α-amilase dari isolat terpilih.

‡ Alamat kini: Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Jalan Ir. Sutami, Surakarta 51726
* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-315107, E-mail: asuwanto@indo.net.id

BAHAN DAN METODE

Galur Bakteri, Plasmid, dan Media. Galur *Escherichia coli* yang digunakan ialah TOP10 (Invitrogen, CA) dan JM109 (Promega, WI). Plasmid yang digunakan dalam penelitian ini ialah pCR®2.1-TOPO® (Km^r, Amp^r; Invitrogen, CA) dan pGEM®-T Easy (Amp^r; Promega, WI). Isolat bakteri halofil dikulturkan pada media Luria Bertani padat (LA) yang mengandung NaCl 15% atau media salin (SW) yang mengandung total garam 15% dan ditambah ekstrak khamir 0.5% (Difco) pada suhu ruang (Coronado *et al*. 2000). Semua galur *E. coli* dikulturkan pada media LA atau Luria Bertani cair (LB) pada suhu 37^{0}C. Bila diperlukan, antibiotik Kanamisin 25 µg/ml dan Ampisilin 100 µg/ml digunakan pada media.

Pengambilan Sampel. Bledug Kuwu terletak di Kabupaten Grobogan, sekitar 50 km arah tenggara Kota Semarang, memiliki ketinggian 53 m di atas permukaan laut dengan areal seluas 45 ha. Saat pengambilan sampel dilakukan pengukuran suhu udara, suhu lumpur, pH, salinitas, posisi, serta deskripsi lokasi lainnya. Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel lumpur, air jantu (air hasil rembesan pembuatan garam), dan air asin (air untuk pembuatan garam). Sampel lumpur dimasukkan ke dalam plastik, sampel air jantu, dan air asin dimasukkan ke dalam botol steril.

Kultur Pengkayaan dan Pemurnian Isolat Bakteri Halofil. Bakteri yang terdapat pada sampel lumpur, air jantu, dan air asin masing-masing ditumbuhkan dalam media LB yang mengandung 0.1% tripton dan 0.05% ekstrak khamir, ditambah dengan air dari lokasi pengambilan sampel yang memiliki salinitas 8%, diinkubasi pada 30^{0}C dengan inkubator bergoyang 250 rpm selama 1 x 24 jam, 2 x 24 jam, dan 3 x 24 jam. Sebanyak 0.1 ml kultur disebar pada media LA yang dimodifikasi, mengandung tripton 0.1%, ekstrak khamir 0.05%, dan air dari lokasi pengambilan sampel serta agar-agar 1.5%, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 1 x 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati warna, ukuran, dan bentuknya. Tiap koloni yang berbeda dimurnikan dan isolat yang telah murni disimpan pada agar-agar miring. Untuk penyimpanan yang lebih lama digunakan *cryotube buffer*.

Uji Amilolitik. Untuk melihat adanya aktivitas amilolitik, isolat yang telah murni ditumbuhkan pada media SW padat yang ditambah dengan pati larut 1% (Merck), lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 x 24 jam. Selanjutnya pada media yang telah ditumbuhi isolat ditetesi larutan lugol. Isolat yang menghasilkan amilase akan membentuk zona bening di sekeliling koloni.

Analisis Gen 16S-rRNA. Isolat Bledug Kuwu yang diketahui memiliki aktivitas amilolitik, dilihat kekerabatannya dengan prokariota lain yang ada di basis data berdasarkan sekuens gen 16S-rRNA-nya.

DNA genom diisolasi dengan metode CTAB (Murray & Thomson 1980), kemudian gen 16S-rRNA-nya diamplifikasi menggunakan primer domain bakteri, yaitu 63f dan 1387r (Marchesi *et al*. 1998). Produk *polymerase chain reaction* (PCR) diklon pada vektor plasmid pCR®2.1-TOPO (3.9 kb) dengan kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, CA). Plasmid rekombinan yang diperoleh kemudian diukur konsentrasinya dan dimurnikan dengan presipitasi etanol-natrium asetat. Selanjutnya dilakukan sekuens parsial menggunakan piranti *big dye reaction deoxy terminator*. Data sekuen parsial yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam program Fasta3 (http://www.ebi.ac.uk) dan setelah diperoleh kemiripannya dengan prokariota lain yang ada di basis data, kemudian dipilih secara acak beberapa isolat yang ada di dalamnya. Analisis klaster dilakukan menggunakan program ClustalW dari situs web *European Bioinformatics Institute* (EBI) (http://www.ebi.ac.uk) sedangkan pembuatan pohon filogenetika menggunakan program *Treecon* (Van de Peer & De Wachter 1993).

Isolasi DNA Genom Total dan Plasmid. Isolasi DNA genom total dilakukan dengan metode CTAB (Murray & Thomson 1980) dengan sedikit modifikasi, sedangkan isolasi plasmid dilakukan dengan piranti Qiagen (Jerman).

Amplifikasi Gen Penyandi Amilase. Sepasang primer dirancang berdasarkan sekuens gen *amy*H dari *Halomonas meridiana* (Coronado *et al.* 2000) dan *Pseudoalteromonas haloplanktis* A23 (Feller *et al*. 1992). Primer tersebut masing-masing ialah AmyF (5'-GTACAGGTCTCGCC-3') dan AmyR (5'-GCCATATCGGTTTG-3'). PCR dilakukan pada GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, CT) dengan kondisi sebagai berikut: Pre PCR 94^{0}C selama 5 menit; denaturasi 94^{0}C 30 detik, *annealing* 40^{0}C 30 detik, *extension* 72^{0}C 1 menit, dilakukan sebanyak 25 siklus; *post* PCR 72^{0}C selama 5 menit. Pemurnian hasil PCR dilakukan dengan piranti Jetsorb (Genomed Inc., USA).

Kloning Fragmen Hasil PCR. Hasil PCR yang telah dipurifikasi diklon menggunakan dua plasmid, yaitu plasmid pCR®2.1-TOPO® (Km^r, Amp^r; Invitrogen) yang ditransformasikan ke dalam *E. coli* TOP10 dan pGEM®-T Easy (Amp^r; Promega) yang ditransformasikan ke dalam *E.coli* JM109. Transformasi dilakukan menurut metode Sambrook *et al.* (1989). Seleksi transforman dilakukan dengan seleksi biru putih pada media LA dengan Amp dan X-gal 40 µg/ml.

Sekuensing Fragmen Hasil PCR. Sekuensing dilakukan menggunakan cetakan plasmid pAP01, pAP02, dan pAP03. Sebagai primer digunakan primer M13 *forward* dan M13 *reverse. Cycle sequensing* dilakukan dengan piranti *BigDye® Ready Reaction Mix* (Perkin Elmer, CT) menggunakan plasmid yang mengandung fragmen hasil PCR sebagai *template* serta primer M13 *forward* dan *reverse*. *Cycle sequensing* dilakukan pada GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, CT) dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi 96^{0}C selama 10 detik, *annealing* 50^{0}C selama 5 detik, *extension* 60^{0}C selama 4 menit, dilakukan sebanyak 25 siklus. Hasilnya dipresipitasi dengan amonium asetat dan etanol absolut (Sambrook *et al.* 1989), selanjutnya dielektroforesis dan pembacaan hasilnya dilakukan dengan piranti *Automated DNA Sequencer* ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, CT). Hasil sekuens yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan program Fasta3 dari EBI. Analisis ini dilakukan berdasarkan sekuens nukleotida dan sekuens asam amino yang dideduksi dari sekuens nukleotidanya.

Hibridisasi Southern. DNA genom total dari isolat terpilih, yaitu BK-05, dipotong dengan beberapa enzim restriksi: *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Sal*I, dan *Xho*I (New England Biolab, Beverly, MA). Setelah itu DNA hasil pemotongan dielektroforesis pada 1% gel agarose, DNA ditransfer ke membran nilon dengan metode kapiler kemudian dilakukan hibridisasi dengan *probe* (Sambrook *et al.* 1989). *Probe* yang digunakan ialah produk PCR yang dilabel menggunakan piranti NEBlot™Phototope™ (New England Biolab, Beverly, MA), kemudian deteksi dilakukan menggunakan piranti Phototope™-Star Detection (New England Biolab, Beverly, MA). Sebagai penanda digunakan *Biotinylated Lambda DNA-BstEII Digest* (New England Biolab, Beverly, MA). Film yang digunakan ialah *high performance autoradiography film hyperfilm*™MP (Amersham Life Science, UK).

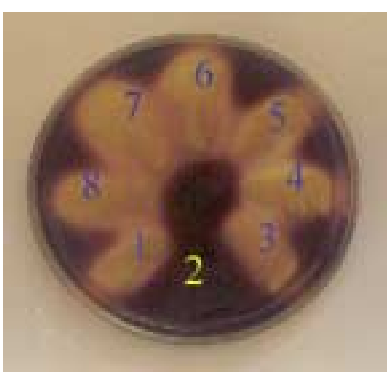
HASIL

Delapan isolat yang secara morfologi berbeda diperoleh dari sampel lumpur, air asin, dan air jantu kolam Bledug Kuwu (Tabel 1). Dari kedelapan isolat tersebut, tujuh isolat menunjukkan aktivitas amilolitik, yaitu isolat nomor 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Gambar 1). Satu isolat, isolat nomor 5, dipilih untuk dikarakterisasi dan diklon gen penyandi amilasenya.

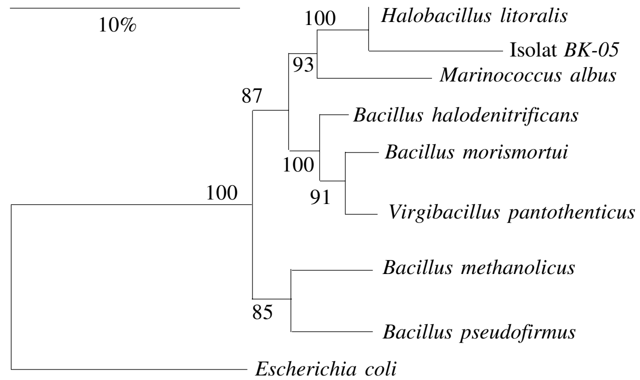
Berdasarkan hasil analisis 16S-rRNA, isolat BK-05 menunjukkan kedekatan dengan *Halobacillus litoralis* yang merupakan spesies bakteri halofil Gram positif. Pohon filogenetika yang menunjukkan kekerabatan isolat ini dengan beberapa spesies bakteri yang ada di basis data dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Isolat bakteri yang diperoleh dari kawasan Bledug Kuwu, Jawa Tengah.

Kode isolat	Asal	Diameter koloni (mm)	Warna koloni
BK-1	Air Jantu	1.0	Kuning tua
BK-2	Air Jantu	0.5	Putih susu
BK-3	Lumpur	1.5	Putih kekuningan
BK-4	Lumpur	1.0	Krem
BK-5	Air Jantu	0.5	Kuning kemerahan
BK-6	Lumpur	0.5	Putih berlendir
BK-7	Lumpur	2.0	Putih kecokelatan
BK-8	Air asin	1.0	kuning



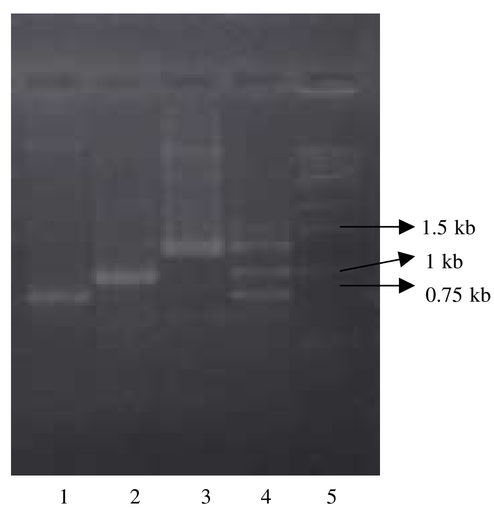
Gambar 1. Isolat bakteri halofil moderat asal Bledug Kuwu pada media Luria Agar yang disuplementasi dengan 1% pati: 1. Isolat BK-01, 2. Isolat BK-02, 3. Isolat BK-03, 4. Isolat BK-04, 5. Isolat BK-05, 6. Isolat BK-06, 7. Isolat BK-07, 8. Isolat BK-08.



Gambar 2. Pohon Filogenetika isolat BK-05 yang menunjukkan kekerabatannya dengan beberapa spesies bakteri yang ada di basis data.

Hasil amplifikasi genom BK-05 melalui PCR dengan primer AmyF dan AmyR menghasilkan tiga pita dengan ukuran masing-masing sekitar 0.75 kb, 1.00 kb, dan 1.50 kb. Kloning fragmen hasil PCR melalui jenis plasmid pCR®2.1-TOPO® ke dalam *E. coli* TOP10 diperoleh delapan koloni putih. Dua transforman membawa sisipan fragmen 1.00 kb, tiga transforman membawa sisipan fragmen 0.75 kb, sisanya hanya membawa vektor saja tanpa sisipan. Sedangkan transformasi menggunakan plasmid pGEM®-T Easy ke dalam *E. coli* JM109 hanya menghasilkan dua koloni putih, satu transforman membawa sisipan fragmen 1.50 kb sedangkan yang lain hanya mengandung vektor saja tanpa sisipan. Masing-masing transforman dipilih satu yang membawa sisipan fragmen tersebut. Plasmid yang membawa fragmen DNA 0.75 kb, 1.00 kb, dan 1.50 kb dari isolat BK-05 berturut-turut disebut pAP01, pAP02, dan pAP03. Gambar 3 menunjukkan hasil amplifikasi genom total BK-05, pAP01, pAP02, dan pAP03 menggunakan primer AmyF dan AmyR.

Hasil sekuensing dari fragmen 0.75 kb tidak menunjukkan kesamaan yang cukup nyata dengan sekuens yang ada di basis data. Sementara hasil sekuensing dari fragmen 1.00 kb



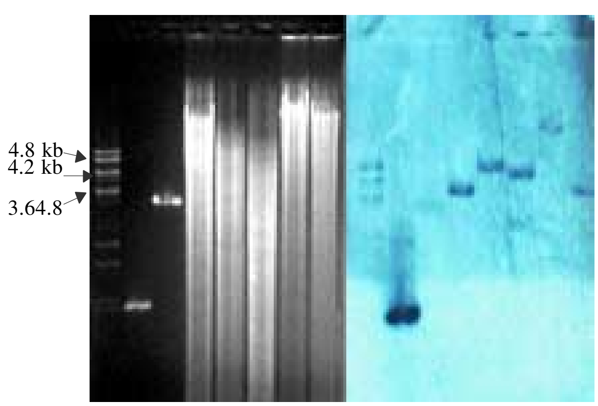
Gambar 3. Hasil amplifikasi plasmid rekombinan dengan menggunakan primer AmyF dan AmyR: 1. pAP01, 2. pAP02, 3. pAP03, 4. BK-05, 5. Standar ukuran molekul 1 kb ladder.

menunjukkan kesamaan yang paling dekat dengan sekuens asam amino enzim *betaine aldehyde dehydrogenase* dari *Bacillus subtilis*. Hasil sekuensing fragmen 1.50 kb menunjukkan kemiripan dengan sekuens nukleotida dari protease alkalin *B. licheniformis* (67.2%), protease *B. subtilis* (60.9%), dan subtilisin *B. stearothermophilus* (59.8%), sedangkan berdasarkan sekuens asam amino hasil deduksi dari sekuens DNA-nya menunjukkan kemiripan dengan metaloprotease dari *B. subtilis* (54.3%).

Hasil analisis hibridisasi Southern menunjukkan bahwa fragmen DNA 1.50 kb terletak dalam fragmen yang berukuran sekitar 4.00 kb pada pemotongan dengan enzim *BamH*I, 4.80 kb pada *EcoR*I, 4.30 kb pada *Hin*dIII, dan 4.00 kb pada *Xho*I; sedangkan pada pemotongan dengan *Sal*I, hasil hibridisasi berada pada fragmen yang berukuran besar yang berada di luar ukuran standar bobot molekul yang digunakan sehingga tidak dapat ditentukan ukurannya. Hasil ini diperoleh kemungkinan karena genom total yang tidak terpotong oleh enzim (Gambar 4).

PEMBAHASAN

Suhu rata-rata lumpur Bledug Kuwu di siang hari 31^0C dan pH lumpur sekitar 7.5. Sampel untuk penelitian ini diambil pada akhir musim hujan. Besarnya diameter Bledug Kuwu bergantung pada musim. Pada musim kemarau diameter dan rongga menyempit, letupan agak lambat karena tanah mengkristal, dan ledakan tinggi, sedangkan pada musim hujan diameter melebar dan besar ledakan tidak tinggi. Letupan berasal dari tenaga endogen yang kuat dan ketinggian terkecil ialah 40 cm. Di sekitar lokasi hampir tidak terdapat tumbuhan dan hewan, hanya terdapat rumput pada pinggiran lokasi dan hewan yang datang pada sore hari ialah burung *blekok* (*Ardeola palloides*). Rumput dan burung *blekok* diduga berperan dalam suplai bahan organik bagi mikroorganisme yang hidup di lokasi ini. Di luar kawasan Bledug Kuwu (45 ha) tidak terdapat keunikan lagi. Sumur yang digunakan oleh penduduk di sekitarnya (di luar area Bledug Kuwu) tidak terasa asin. Data lain yang diperoleh dari lokasi Bledug Kuwu ialah salinitas air asin 8%, salinitas lumpur 5-6%, sedangkan salinitas air jantu dapat mencapai 32%. Posisi lokasi pengambilan sampel yang diukur dengan *global positioning systems* (GPS) menunjukkan angka S.07^0 06.972', E.111^0 07.245'. Suhu udara rata-rata 31-32^0C dan pH sampel sekitar 7.5.



Gambar 4. Hasil analisis *Southern blot* dengan menggunakan fragmen 1.5 kb sebagai *probe*. a. Elektroforesis sebelum hibridisasi. b. Hasil hibridisasi *Southern blot*: lajur 1. standar ukuran molekul: λ-*Bst*EII, 2. kontrol positif: 1.5 kb, 3. kontrol negatif: digesti pAS900-*Eco*RI, 4, 5, 6, 7, dan 8 berturut-turut digesti BK-05-*Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Sal*I, dan *Xho*I.

Primer untuk mengamplifikasi gen penyandi α-amilase dirancang berdasarkan sekuens gen *amyH* dari *H. meridiana* dan *P. haloplanktis*. Gen *amyH* dari *H. meridiana* adalah satu-satunya gen penyandi α-amilase dari bakteri halofil yang telah berhasil diklon dan dikarakterisasi. Gen ini menunjukkan kekerabatan dekat dengan gen penyandi α-amilase dari *P. haloplanktis,* isolat bakteri psikrofil yang berasal dari Antartika. Hasil amplifikasi genom BK-05 menggunakan primer AmyF dan AmyR menghasilkan tiga fragmen dengan ukuran masing-masing sekitar 0.75 kb, 1.00 kb, dan 1.50 kb. Setelah optimasi menggunakan suhu *annealing* yang berbeda-beda (40^0C, 41^0C, 42^0C), ketiga fragmen ini muncul secara konsisten. Hasil amplifikasi tidak berupa fragmen tunggal sehingga masing-masing fragmen tersebut perlu diklon terlebih dahulu pada vektor plasmid untuk kemudian dianalisis dengan sekuensing untuk mengetahui fragmen yang diinginkan.

Hasil sekuensing parsial fragmen 0.75 kb tidak menunjukkan kesamaan yang cukup nyata dengan sekuens yang ada di basis data sehingga tidak dianalisis lebih lanjut, kemungkinan fragmen ini hanya hasil amplifikasi yang tidak spesifik. Hasil sekuensing parsial fragmen 1.00 kb menunjukkan kesamaan yang paling dekat dengan sekuen asam amino enzim *betaine aldehyde dehydrogenase* dari *B. subtilis*. Enzim ini berperanan dalam sintesis betaine, yaitu salah satu jenis osmoprotektan yang diakumulasi dalam sel bakteri halofil moderat untuk mengatasi cekaman lingkungan berkadar garam tinggi.

Hasil analisis sekuensing parsial fragmen 1.50 kb dari BK-05 ternyata menunjukkan kemiripan dengan beberapa kelompok enzim protease, meskipun primer yang digunakan awalnya dirancang berdasarkan sekuens gen penyandi amilase. Menurut Eisenberg *et al*. (1992) semua enzim ekstraseluler, termasuk protease dan amilase, dari bakteri halofil menunjukkan karakteristik yang mirip, antara lain mengandung banyak residu asam amino yang bersifat asam (sampai 20% dari total residu asam amino dalam suatu protein). Selain itu, kebanyakan protein dari bakteri halofil juga menunjukkan sedikitnya residu asam amino hidrofobik untuk menghindari terjadinya *salting-out*. Dengan adanya kemiripan karakteristik antarenzim ekstraseluler pada bakteri halofil tersebut, maka memungkinkan terjadinya amplifikasi gen penyandi protease yang memiliki kemiripan dengan gen penyandi amilase. Dengan demikian, gen yang terisolasi kemungkinan gen amilase yang punya bagian mirip protease atau gen yang terisolasi memang suatu gen protease. Jadi dengan demikian, primer yang digunakan mungkin mampu mengamplifikasi daerah konservatif bagi semua enzim halofilik. Data sekuens menunjukkan bahwa DNA yang teramplifikasi mirip gen penyandi protease alkalifilik yang diperkirakan juga memiliki daerah konservatif tersebut. Primer yang dirancang tersebut mungkin berada di wilayah konservatif bagi semua enzim halofil sehingga dapat mengamplifikasi enzim halofilk yang lain, dalam hal ini proteasenya. Sebagai tambahan, penelitian kami juga menunjukkan bahwa isolat BK-05 bersifat proteolitik.

Semua klon *E. coli* yang mengandung vektor yang membawa sisipan fragmen hasil PCR tidak menunjukkan aktivitas hidrolitik, baik amilolitik maupun proteolitik. Hal ini kemungkinan karena enzim halofil terdenaturasi dan terdisosiasi dengan cepat pada konsentrasi garam di bawah 1M dan dapat bersifat tidak balik. Kemungkinan lain, fragmen tersebut hanya membawa sebagian gen penyandi enzim sehingga protein yang dihasilkan tidak fungsional. Untuk itu perlu dilakukan lokalisasi gen tersebut pada genom total BK-05 sehingga seluruh gen lengkap dapat diklon untuk selanjutnya dapat dikarakterisasi. Lokalisasi dilakukan menggunakan fragmen 1.5 kb hasil PCR sebagai pelacak. Berdasarkan hasil analisis hibridisasi Southern tersebut, untuk mengklon gen lengkap, fragmen hasil pemotongan enzim restriksi seperti disebutkan di atas dapat diisolasi dan diklon. Agar hasil ekspresi teramati, dapat dipertimbangkan penggunaan inang yang halofil juga.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh *Research Center for Microbial Diversity*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor; dan dana Hibah Tim *batch* IV, *University Research for Graduate Education*, Departemen Pendidikan Nasional (No.005/ADD.II/HTPP-IV/URGE/ 2000).

DAFTAR PUSTAKA

Coronado MJ, Vargas C, Mellado E, Tegos G, Drainas C, Nieto JJ, Ventosa A. 2000. The α-amylase gene *amyH* of the moderate halophile *Halomonas meridiana*: cloning and molecular characterization. *Microbiology* 146:861-868.

Eisenberg H, Mevarech M, Zaccai G. 1992. Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism. *Adv Prot Chem* 43:1-62.

Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, Libioulle C, Van Beeumen J, Gerday C. 1992. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile α-amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanktis* A23. *J Biol Chem* 267:5217-5221.

Khire JM. 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt pan. *Lett Appl Microbiol* 19:210-212.

Kobayashi T, Kamekura M, Kamlayakrit W, Onishi H. 1986. Production, purification, characterization of an amylase of the moderate halophile *Micrococcus varians* subsp. *Halophilus*. *Microbiology* 46:165-170.

Kushner DJ. 1985. The halobacteriaceae. Di dalam: Woesse CR, Wolfe RS (ed). *The Bacteria.* Vol. 8. London: Academic Pr. hlm 171-214.

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wadde WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-spesific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S-rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795-799.

Murray MG, Thomson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc Acid Res* 19:823-881.

Onishi H. 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic *Micrococcus*. *J Bacteriol* 109:570-574.

Onishi H, Hidaka O. 1978. Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. *Can J Microbiol* 24:1017-1023.

Onishi H, Sonoda K. 1979. Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Appl Environ Microbiol* 38:616-620.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Book 1. New York: Cold Spring Harbor.

Sipayung RJ. 1999. Analisis fisiologis dan karakterisasi gen 16S-rRNA isolat bakteri dari kawasan Bledug Kuwu. [Skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Van de Peer Y, De Wachter R. 1993. TREECON, a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput Applic Biosci* 9:177-182.

Ventosa A, Nietto JJ. 1995. Biotechnology application and potentialities of halophilic microorganisms. *W J Microbiol Biotechnol* 11:85-94.

Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:504-544.