

EKSPLORASI KEANEKARAGAMAN MIKROB DI KAWAH DOMAS DAN KAWAH CANDRADIMUKA MENGGUNAKAN SHOTGUN METAGENOMIK

HARYONO BUDI SANTOSO



**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Eksplorasi Keanekaragaman Mikrob di Kawah Domas dan Kawah Candradimuka menggunakan *Shotgun* Metagenomik ” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, November 2024

Haryono Budi Santoso
P0501222027

@Hak cipta milik IPB University

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

HARYONO BUDI SANTOSO. Eksplorasi Keanekaragaman Mikrob di Kawah Domas dan Kawah Candradimuka menggunakan *Shotgun* Metagenomik. Dibimbing oleh ANTONIUS SUWANTO dan RAHADIAN PRATAMA.

Indonesia mempunyai banyak mata air panas yang sepenuhnya menyimpan mega biodiversitas. Salah satu mata air panas yang banyak dieksplorasi adalah Kawah Domas yang mempunyai pH asam dan Kawah Candradimuka yang mempunyai pH netral. Kondisi ekstrim yang dimiliki dua lokasi ini menyimpan potensi mikrob yang sangat potensial terutama terkait enzim-enzim termofilik. Penelitian terdahulu dilakukan menggunakan metode konvensional pengkulturan mikrob sehingga masih banyak keragaman mikrob yang belum teridentifikasi. Tujuan dari penelitian ini adalah menggunakan metode *shotgun* metagenomik untuk mengeksplorasi keragaman mikrob dalam Kawah Candradimuka dan Kawah Domas. Penelitian ini mengaplikasikan teknik pengambilan sampel dari kawah, mengoptimasi ekstraksi DNA hingga sekuensing serta mengaplikasikan beberapa perangkat lunak bioinformatika untuk mengkaji keragaman mikrob, mengidentifikasi gen-gen fungsional serta merekonstruksi genom dari data metagenom.

Hasil dari penggunaan *shotgun* metagenomik ini mampu mengidentifikasi mikrob baik yang sebelumnya telah dilaporkan maupun penemuan jenis mikrob baru. Kawah Candradimuka mempunyai kelimpahan tinggi untuk arkaea *Pyrobaculum* dan bakteri *Sulfurihydrogenibium* sedangkan Kawah Domas mempunyai kelimpahan tinggi untuk bakteri *Hydrogenobaculum* dan arkaea *Sulfurisphaera*. Sebanyak 13 *Metagenome-assembled genome* (MAGs) berhasil direkonstruksi dari Kawah Candradimuka dan 8 MAGs dari Kawah Domas dengan kualitas tinggi. Analisis fungsional dilakukan pada 21 MAGs tersebut dan mengungkap beberapa karakteristik potensial untuk enzim-enzim yang berkaitan dengan metabolisme karbohidrat (CAZyme), Klaster gen dalam biosintesis metabolit sekunder (BGCs), gen – gen terkait metabolisme elemen mikro (mikroTrait) serta gen-gen pengkode DNA polimerase. Hasil analisis Pangenom menunjukkan bahwa MAGs KD_018 *Hydrogenobaculum* dan KC_015 *Pyrobaculum* merupakan temuan baru dari Indonesia yang belum pernah dilaporkan dalam penelitian sebelumnya. Keduanya memiliki beberapa klaster gen unik yang membedakan mereka dengan spesies lain dalam genus yang sama.

Kata kunci: bioprospeksi, mata air panas, mikrob, *shotgun* metagenomik, termofilik

SUMMARY

HARYONO BUDI SANTOSO. Exploration of Microbial Diversity in Domas Crater and Candradimuka Crater using Shotgun Metagenomics. Supervised by ANTONIUS SUWANTO and RAHADIAN PRATAMA.

Indonesia has numerous hot springs that harbor a vast mega biodiversity. Two of the most explored hot springs are Domas Crater, which has an acidic pH, and Candradimuka Crater, which has a neutral pH. The extreme conditions in these two locations hold great microbial potential, particularly related to thermophilic enzymes. Previous research that has been conducted, mainly relied on conventional method of culturing microbes, which often left many of the microbial diversity unidentified. The aim of this study is to use shotgun metagenomics to explore the microbial diversity in Candradimuka and Domas Craters. This research involved sampling from the craters, optimizing DNA extraction, sequencing, and applying various bioinformatics tools to study microbial diversity, identify functional genes, and reconstruct genomes from sequencing data.

The use of shotgun metagenomics allowed the identification of both previously reported microbes and the discovery of new microbial species. Candradimuka Crater showed a high abundance of the archaeon *Pyrobaculum* and the bacterium *Sulfurihydrogenibium*, while Domas Crater was dominated by the bacterium *Hydrogenobaculum* and the archaeon *Sulfurisphaera*. We successfully reconstructed 13 high-quality Metagenome-Assembled Genomes (MAGs) from Candradimuka Crater and 8 MAGs from Domas Crater. Functional analysis of these 21 MAGs revealed several potential characteristics, including enzymes related to carbohydrate metabolism (CAZymes), gene clusters involved in secondary metabolite biosynthesis (BGCs), genes related to micronutrient metabolism (microTrait), and DNA polymerase-encoding genes. Pangenome analysis revealed that MAGs KD_018 *Hydrogenobaculum* and KC_015 *Pyrobaculum* are newly identified species from Indonesia that have not been previously reported. Both have several unique gene clusters that differentiate them from other species within the same genus.

Keywords: bioprospecting, hot springs, microbes, shotgun metagenomics, thermophiles.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.

EKSPLORASI KEANEKARAGAMAN MIKROB DI KAWAH DOMAS DAN KAWAH CANDRADIMUKA MENGGUNAKAN SHOTGUN METAGENOMIK

HARYONO BUDI SANTOSO

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

@Hak cipta milik IPB University

IPB University





Tim Penguji pada Ujian Tesis:

1 Dr. Adi Yulandi S.Si., M.T

2 Dr. Prayoga Suryadarma S.TP., M.T

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Tesis : Eksplorasi Keanekaragaman Mikrob di Kawah Domas dan Kawah
Candradimuka menggunakan *Shotgun* Metagenomik
Nama : Haryono Budi Santoso
NIM : P0501222027

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc.

Pembimbing 2:
Dr. rer. nat. Rahadian Pratama, S.Si, M.Si.



Digitally signed by:
Antonius Suwanto

Date: 5 Nov 2024 10:47:03 WIB
Verify at design.ipb.ac.id



Digitally signed by:
Rahadian Pratama

Date: 5 Nov 2024 21:56:00 WIB
Verify at design.ipb.ac.id

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
NIP. 196204191989031001

Dekan Sekolah Pascasarjana
Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc., F.Trop., IPU
NIP. 197003291996081001



Tanggal Ujian :

15 Oktober 2024

Tanggal Lulus :



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga tesis ini berhasil diselesaikan. Tesis dengan judul “Eksplorasi Keanekaragaman Mikrob di Kawah Domas dan Kawah Candradimuka menggunakan *Shotgun Metagenomik*” ini adalah pra-syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains (M.Si) pada program studi Bioteknologi.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Prof. Dr. Ir. Antonius Suwanto, M.Sc dan Dr. rer. nat. Rahadian Pratama, S.Si, M.Si yang telah membimbing dan banyak memberi masukan serta saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Adi Yulandi S.Si., MT. dan Dr. Prayoga Suryadarma S.Tp. M.T sebagai penguji luar komisi pembimbing, Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si sebagai Ketua Program Studi Bioteknologi, seluruh dosen pengajar selama penulis menempuh di Program Studi Bioteknologi, serta Keresyanto Kaparang, A.Md yang telah banyak membantu dalam dari segi ilmu dan bantuan teknis. Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh direksi dan staf PT. Anugerah Rekayasa Bioteknika yang telah memberikan izin penulis untuk melanjutkan studi S2 ini. Terima kasih turut disampaikan kepada staf Laboratorium Saraswanti Genomics Institut yang telah membantu selama proses penelitian. Terima kasih juga disampaikan kepada ayah, serta kakak yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya selama penulis melakukan studi. Selain itu ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Annas, Krisna, dan Usi yang banyak membantu dalam diskusi saat penulisan karya ilmiah ini.

Meskipun penulis telah berusaha menyelesaikan tesis ini dengan maksimal, tetapi penulis menyadari bahwa tesis ini masih bisa dikembangkan lebih baik lagi. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca guna menyempurnakan segala kekurangan dalam penyusunan tesis ini. Penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi pihak lain yang membutuhkan demi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, November 2024

Haryono Budi Santoso

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Penelitian Mikrob di Mata Air Panas	3
2.2 Mikroorganisme Termofilik	4
2.3 <i>Shotgun</i> Metagenomik	6
2.4 Perangkat lunak Bioinformatika Yang Biasa Digunakan Dalam Analisis <i>Shotgun</i> Metagenomik	7
III METODE	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Prosedur Kerja	11
3.3.1 Pengambilan Sampel dan Deskripsi Lokasi Pengambilan	11
3.3.2 Ekstraksi DNA	12
3.3.3 Pembuatan <i>Library Preparation</i>	13
3.3.4 Sekuensing – <i>Shotgun</i> Metagenomik	13
3.3.5 Analisis Bioinformatika	13
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Persiapan Sampel DNA dan Data Hasil Sekuensing	15
4.2 Profil Kelimpahan Taksonomi	16
4.3 Analisis Fungsional dari Data Metagenomik	19
4.4 Rekonstruksi <i>Metagenome-assembled Genome</i> (MAGs)	20
4.5 Analisis Fungsional dari <i>Metagenome-assembled Genome</i> (MAGs)	23
4.6 Pangenomik untuk MAGs dengan Kelimpahan Tinggi	27
V SIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Simpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	41
RIWAYAT HIDUP	48

DAFTAR TABEL

1	Eksplorasi Mikrob yang telah dilakukan di area Kawah Domas dan Kawah Candradimuka.	4
2	Statistik data hasil sekuensing	16
3	Perbandingan perakitan metagenomik	21
4	Hasil rekonstruksi MAGs dengan kualitas tinggi dari kedua Kawah	22

DAFTAR GAMBAR

1	Ilustrasi dan Foto lokasi pengambilan pada kedua kawah	12
2	Kelimpahan relatif mikrob dari kawah Candradimuka pada level genus	17
3	Kelimpahan relatif mikrob dari kawah Domas pada level genus	18
4	Klasifikasi gen fungsional berdasarkan COG	19
5	Klasifikasi gen fungsional berdasarkan KEGG	20
6	Klasifikasi Gen terkait CAZyme dan Klaster Gen Biosintetik dari MAGs	24
7	Klasifikasi DNA Polimerase dan Gen terkait metabolisme elemen (mikroTrait) dari MAGs	26
8	Pangenomik dari MAGs yang memiliki kelimpahan tertinggi dari Kawah Candradimuka	28
9	Pangenomik dari MAGs yang memiliki kelimpahan tertinggi dari Kawah Domas	29

DAFTAR LAMPIRAN

1	Alur Penelitian mulai dari pengambilan sampel hingga dilakukan analisis bioinformatika	41
2	Alur pengerjaan analisis Bioinformatika	42
3	Visualisasi dalam krona untuk mikrob yang sebelumnya ditemukan pada penelitian terdahulu dan dideteksi dengan metode <i>shotgun</i> metagenomik dengan kelimpahan rendah.	43
4	MAGs yang berhasil direkonstruksi dari data Kawah Candradimuka (20) dan Kawah Domas (25)	46
5	Genom yang dipakai untuk perbandingan analisis pangenom	47