

**ANALISIS KEANEKARAGAMAN GENETIK BAKTERI  
TERMOFILIK ASAL SEMENDO MENGGUNAKAN GEN 16S  
rRNA**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di  
Jurusan Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Oleh:**

**TITUS TRIAS TRAPSILA**

**08041291924050**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA  
2023**

## HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

Judul Proposal Skripsi : Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik  
Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA  
Nama Mahasiswa : Titus Trias Trapsila  
NIM : 08041281924050  
Jurusan : Biologi

Telah disetujui untuk disidangkan pada tanggal 10 Maret 2023

Indralaya, Maret 2023

Pembimbing:

1. Dra. Muharni, M.Si.  
NIP. 196306031992032001



(.....)

## HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Judul Skripsi : Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA  
Nama Mahasiswa : Titus Trias Trapsila  
NIM : 08041281924050  
Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi

Telah dipertahankan di hadapan Pembimbing dan Penguji Sidang Sarjana Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya pada Tanggal 10 Maret 2023 dan telah diperbaiki, diperiksa, dan disetujui sesuai dengan masukan yang telah diberikan.

Indralaya, Maret 2023

Pembimbing:

Dra. Muharni, M.Si.  
NIP.196306031992032001

Penguji:

Dr. Elisa Nurnawati, S.Si., M.Si.  
NIP. 197504272000122001

Dr. Hary Widjajanti, M.Si.  
NIP. 196112121987102001

(.....  
.....  
.....  
.....)

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Sriwijaya

  
Dr. Armi Setiawan, S.Si., M.Si.  
NIP. 197211221998031001

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Judul Proposal Skripsi : Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA  
Nama Mahasiswa : Titus Trias Trapsila  
NIM : 08041281924050  
Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan karya ilmiah ini belum pernah diajukan sebagai pemenuhan persyaratan untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata satu (S1) dari Universitas Sriwijaya maupun perguruan tinggi lain.

Semua informasi yang dimuat dalam skripsi ini yang berasal dari penulis lain baik yang dipublikasikan atau tidak telah diberikan penghargaan dengan mengutip nama sumber penulis secara benar. Semua isi dari skripsi ini sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya sebagai penulis.

Demikianlah surat pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.



Indralaya, Maret 2023

Penulis,



Titus Trias Trapsila  
NIM. 08041281924050

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK  
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Titus Trias Trapsila  
NIM : 08041281924050  
Fakultas/Jurusan : FMIPA/Biologi  
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Sriwijaya “Hak bebas royalti non-eksklusif (*non-exclusively royalty-free right*)” atas karya ilmiah saya yang berjudul: “Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA”

Dengan hak bebas royalti non-eksklusif ini Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih media/memformatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir atau skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Indralaya, Maret 2023  
Yang menyatakan,



Titus Trias Trapsila  
NIM. 08041281924050

## HALAMAN PERSEMBAHAN

*I dedicate this thesis to:*

*God Almighty*

*Dear Mum and Dad*

*My extended family*

*My almamater*

### **Motto:**

*Everyone has their own journey and life process. Don't compare yourself to others because everyone is special and different. No one is born the same in this world. A great person is not someone who is always the best, number one, or a winner, but someone who is able to survive, rise and face problems in his life. Life is precious, so celebrate this amazing gift from God: life.*



*Don't let someone else's negativity cancel out your light.*



*Yes, be bold and strong! For remember, the Lord your God is with you wherever you go.*

*Joshua 1:9*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul “**Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA**”. Skripsi ini disusun untuk dapat memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya.

Penulisan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa adanya bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Ibu Dra. Muharni, M.Si., serta Dr. Elisa Nurnawati, S.Si., M.Si. selaku dosen pembahas atas bimbingan, arahan, saran, nasihat, dan kesabarannya selama pelaksanaan penelitian serta penulisan skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Hermansyah, S.Si., M.Si., Ph. D. Selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.
2. Dr. Arum Setiawan, M.Si. Selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.
3. Dr. Sarno, M.Si. Selaku Sekretaris Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya dan Selaku

Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama perkuliahan berlangsung.

4. Seluruh Dosen dan Staff Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Indralaya khususnya Dosen Program Studi Biologi.
5. Kak Agus Wahyudi, S.Si. selaku analis Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi yang banyak membantu dalam kegiatan di laboratorium.
6. Meuthea, Hanindita, Regin, dan Michelle yang sudah memotivasi dan mendukung selama perkuliahan.
7. Tim penelitian di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi yang sudah menemani dan membantu selama penelitian di lab.
8. Serta kawan-kawan lainnya yang secara langsung maupun tidak, turut membantu dan memotivasi.
9. Seluruh angkatan 2019 yang pernah bersama-sama menjadi pejuang wisuda.
10. Adik tingkat terutama angkatan 2020 dan 2021 yang antusias mengucapkan terima kasih untuk sempro, semhas, dan sidang.
11. Serta pihak-pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Harapan penulis, semoga skripsi ini dapat menjadi referensi bagi civitas akademik dan masyarakat umum atau dilakukan penelitian lebih lanjut, sehingga didapatkan data yang lebih lengkap. Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam



penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu kritik dan saran sangat diperlukan untuk kebaikan skripsi ini di masa mendatang.

Indralaya, Maret 2023

Penulis,

Titus Trias Trapsila

NIM. 08041281924050

# **Genetic Diversity Analysis of Thermophilic Bacteria from Semendo Using 16S rRNA Gene**

**Titus Trias Trapsila**

**NIM: 08041281924050**

## **SUMMARY**

The genetic diversity of thermophilic bacteria can be determined by analysing the 16S rRNA encoding gene because this sequence region is a good target for reviewing genetic changes. Basically, thermophilic bacteria have a wide genetic diversity in the domain of Bacteria. Knowledge of the genetic diversity of thermophilic bacteria is very useful for the conservation of genetic resources and can provide a basic information in further biotechnology development applications. Besides being used to analyse the genetic diversity of thermophilic bacteria, 16S rRNA encoding gene analysis is one of the methods that can be used in research on bacterial species identification and molecular evolution. Thermophilic bacteria are actively researched because they produce thermostable enzymes that have prospects in industrial applications. Research on "Analysis of Genetic Diversity of Thermophilic Bacteria of Semendo Origin Using 16S rRNA Genes was conducted from August to December 2022, at the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University. This study aims to analyse the genetic and species diversity as well as the phylogenetic relationship of thermophilic bacteria from Semendo hot springs using 16S rRNA gene. Phylogenetic relationship analysis was conducted using MEGA 11 application based on neighbor joining algorithm with bootstrap value of 1000 repetitions. Analysis of haplotype diversity using DnaSp5 application. The isolation results obtained 6 isolates namely SAA, SAB, SLA1, SLA2, SLB1, and SLB2 from 4 samples originating from Semendo hot springs. The six isolates have the characteristics of bacillus-shaped and able to produce endospores. Colony morphological characters vary but the colony colour is dominated by white. The genome of thermophilic bacterial isolates that were successfully sequenced had a number of base pairs ranging from 1,444-1,519 base

pairs. The sequencing results of SLB1 isolate were not read so that no further alignment and analysis were carried out. The alignment results obtained there are mutation sites of deletion, insertion, and substitution both transitions and transversions that indicate the existence of genetic diversity. The thermophilic bacterial species from Semendo hot springs that can be identified are *Paenibacillus phoenicis* Strain 3PO2SA, *Anoxybacillus flavithermus* Strain AE3, *Anoxybacillus geothermalis* Strain D9, and *Anoxybacillus rupiensis* strain X-08. Bacterial isolates that were successfully identified had varying genetic distances and polymorphic sites, indicating genetic diversity. Based on the phylogenetic tree, it can be assumed that isolates SAA and SAB are closely related to *Paenibacillus phoenicis* Strain 3PO2SA. Isolates SLA1, SLA2, and SLB2 are related to *Anoxybacillus flavithermus* strain AE3, *Anoxybacillus geothermalis* Strain D9, and *Anoxybacillus rupiensis* strain X-08, respectively.

**Keywords** : Genetic diversity, Phylogenetic Analysis, Thermophilic bacteria, 16S rRNA gene.

# **Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA**

**Titus Trias Trapsila**

**NIM: 08041281924050**

## **RINGKASAN**

Keanekaragaman genetik bakteri termofilik dapat ditentukan dengan menganalisis gen pengode 16S rRNA karena region sekuens ini adalah sasaran untuk meninjau perubahan genetik yang baik. Pada dasarnya bakteri termofilik memiliki keanekaragaman genetik yang luas di dalam domain Bacteria. Pengetahuan mengenai keanekaragaman genetik bakteri termofilik sangat berguna untuk konservasi sumber daya genetik serta dapat menyediakan suatu informasi dasar dalam aplikasi pengembangan bioteknologi selanjutnya. Selain digunakan untuk menganalisis keanekaragaman genetik bakteri termofilik, analisis gen pengode 16S rRNA menjadi salah satu metode yang dapat dimanfaatkan dalam penelitian identifikasi spesies bakteri serta evolusi molekulernya. Bakteri termofilik saat ini intensif diteliti karena dapat menghasilkan enzim termostabil yang memiliki prospek dalam aplikasi industri. Penelitian tentang “Analisis Keanekaragaman Genetik Bakteri Termofilik Asal Semendo Menggunakan Gen 16S rRNA telah dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan Desember 2022, bertempat di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sriwijaya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keanekaragaman genetik dan spesies serta hubungan filogenetik bakteri termofilik asal sumber air panas Semendo menggunakan gen 16S rRNA. Analisis hubungan filogenetik dilakukan dengan menggunakan aplikasi MEGA 11 berdasarkan algoritma *neighbor joining* dengan nilai *bootstrap* sebanyak 1000 kali pengulangan. Analisis keanekaragaman *haplotype* menggunakan aplikasi DnaSp5. Hasil isolasi didapatkan 6 isolat yakni SAA, SAB, SLA1, SLA2, SLB1, dan SLB2 dari 4 sampel yang berasal dari sumber air panas Semendo. Keenam isolat memiliki ciri yakni berbentuk basilus dan mampu menghasilkan endospora. Karakter morfologi koloni bervariasi namun warna koloni didominasi oleh warna putih. Genom isolat bakteri termofilik yang berhasil disekuensing memiliki jumlah pasang basa berkisar pada 1.444-1.519 pasang basa. Hasil sekuensing isolate SLB1 tidak terbaca sehingga tidak dilakukan penyejajaran dan analisis lebih lanjut. Hasil penyejajaran didapatkan terdapat situs mutasi delesi, insersi, dan substitusi baik itu transisi maupun tranversi yang menunjukkan adanya keanekaragaman genetik.

Spesies bakteri termofilik asal sumber air panas Semendo yang dapat teridentifikasi adalah *Paenibacillus phoenicis* Strain 3PO2SA, *Anoxybacillus flavithermus* Strain AE3, *Anoxybacillus geothermalis* Strain D9, dan *Anoxybacillus rupiensis* strain X-08. Isolat bakteri yang berhasil diidentifikasi memiliki jarak genetik dan situs polimorfik yang bervariasi sehingga menunjukkan adanya keanekaragaman genetik. Berdasarkan pohon filogenetik dapat diasumsikan isolat SAA dan SAB berkerabat dekat dengan *Paenibacillus phoenicis* Strain 3PO2SA. Isolat SLA1, SLA2, dan SLB2 secara berurutan memiliki kekerabatan dengan *Anoxybacillus flavithermus* strain AE3, *Anoxybacillus geothermalis* Strain D9, dan *Anoxybacillus rupiensis* strain X-08.

**Kata Kunci:** Analisis Filogenetik, Bakteri Termofilik, Gen 16S rRNA, Keanekaragaman genetik

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
RESUME.....	x
RINGKASAN.....	xii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Sumber Air Panas.....	6
2.2 Bakteri Termofilik.....	7
2.3 Keanekaragaman Genetik Bakteri.....	9
2.4 Identifikasi Bakteri dengan 16S rRNA.....	10
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	14
2.6 Sekuensing DNA.....	16
2.7 Analisis Filogenetik.....	17
BAB III METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Waktu dan Tempat.....	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan.....	19
3.3 Cara Kerja.....	20
3.3.1 Pembuatan Media dan Sterilisasi Alat Bahan.....	21
3.3.2 Isolasi dan Pemurnian Bakteri Termofilik.....	21
3.3.3 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Bakteri Termofilik... 22	
3.3.4 Isolasi DNA Bakteri Termofilik.....	23
3.3.5 Elektroforesis DNA Hasil Isolasi.....	25
3.3.6 Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	25

3.3.7	Sekuensing DNA .....	26
3.3.8	Analisis Keanekaragaman <i>Haplotype</i> .....	26
3.3.9	Analisis Filogenetik .....	27
3.3.10	Analisis Data .....	28
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>28</b>
4.1	Isolasi Bakteri Termofilik .....	28
4.2	Ekstraksi DNA Genom Bakteri Termofilik .....	32
4.3	Amplifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Termofilik .....	35
4.4	Jumlah Total Pasangan Basa Isolat Bakteri Termofilik .....	38
4.5	Hasil Multiple Alignment .....	38
4.6	Keanekaragaman <i>Haplotype</i> .....	47
4.7	Homologi Search BLAST ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ) NCBI .....	49
4.8	Jarak Genetik .....	51
4.9	Analisis Filogenetik .....	55
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>62</b>
5.1	Kesimpulan .....	62
5.2	Saran .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>64</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>65</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Daftar Primer yang Digunakan .....	20
Table 2 Karakter Fenotipik Isolat Bakteri Termofilik .....	28
Tabel 3. Konsentrasi DNA Genom Bakteri Termofilik Hasil Ekstraksi.....	32
Tabel 4. Total Pasang Basa Sekuens Bakteri Termofilik.....	38
Tabel 5. Variasi Basa Nukleotida dan Total <i>Gap</i> .....	40
Tabel 6. Variasi basa nukleotida sekuens SAA dan SAB (dilihat dari urutan basa 1 – 600) .....	42
Tabel 7. Variasi basa nukleotida sekuens SLA1 (dilihat dari urutan basa 130–230) .	43
Tabel 8. Variasi basa nukleotida sekuens SLA2 (dilihat dari urutan basa 1-100) .....	44
Tabel 9. Variasi basa nukleotida sekuens SLB2 (dilihat dari urutan basa 259-500) ..	45
Tabel 10. Keanekaragaman <i>haplotype</i> sekuens bakteri termofilik .....	47
Tabel 11. Hasil identifikasi bakteri termofilik dengan teknik BLAST.....	50
Tabel 12. Jarak genetik isolat bakteri termofilik.....	54



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Peta Gen 16S rRNA.....	15
Gambar 2. Bentuk Sel dan sifat Gram Keenam Isolat Bakteri Termofilik.....	32
Gambar 3. Bentuk sel dan Endospora keenam isolat bakteri termofilik.....	33
Gambar 4. Elektroferogram hasil ekstraksi DNA genom isolat bakteri termofilik....	36
Gambar 5. Elektroferogram hasil PCR gen 16S rRNA isolat bakteri termofilik.....	39
Gambar 6. Pohon filogenetik isolat SAA dan SAB.....	57
Gambar 7. Pohon filogenetik isolat SLA1, SLA2, dan SLB2.....	60

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Energi panas bumi dapat termanifestasikan dalam bentuk sumber air panas (*hot spring*) yang muncul ketika air bawah permukaan di reservoir dalam bumi mengalami pemanasan oleh panas bumi. Indonesia menjadi satu di antara beberapa negara dengan sumber daya panas bumi (geotermal) paling melimpah di dunia yang tersebar di 252 lokasi di 26 provinsi (Suddin *et al.* 2019). Sumber air panas menjadi habitat potensial bagi mikroorganisme yang bersifat termofil. misalnya kelas Proteobacteria, Acidobacteria, dan Actinobacteria (Ovando-Chacon *et al.* 2020).

Daerah hidrotermal terestrial yang beragam berpotensi menjadi habitat bagi komunitas besar mikroorganisme termofilik. Sampai tahun 2023, informasi tentang keanekaragaman genetik dan spesies bakteri yang bersifat termofil asal sumber air panas Semendo Provinsi Sumatera Selatan masih terbatas. Penelitian terdahulu mengenai komunitas bakteri termofilik di Sumatera Selatan telah dilakukan di beberapa area geotermal seperti di Tanjung Sakti (Yohandini *et al.* 2015) dan Danau Ranau (Muharni, 2010).

Keanekaragaman genetik merupakan variasi genetik yang terlihat pada perbedaan basa-basa nukleotida penyusun suatu gen dari suatu spesies atau populasi yang dibandingkan dengan spesies atau populasi lainnya. Pada umumnya

bakteri termofilik memiliki keanekaragaman genetik yang luas dalam domain Bacteria. Keanekaragaman genetik bakteri dapat ditentukan dengan menganalisis gen pengode 16S rRNA karena region sekuens ini adalah sasaran untuk meninjau perubahan genetik yang baik (Johnson *et al.* 2019). Keuntungan dari metode molekuler gen pengode 16S rRNA karena gen ini memiliki urutan yang lestari dan juga variasi. Menurut Bukin *et al.* (2019) urutan basa pada region 16S rRNA yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keanekaragaman genetik. Wilayah 16S rRNA memiliki ukuran sekitar 1.500 pb dan memiliki sekuens yang dikenal sebagai *hypervariable region*. Seluruh urutan wilayah 16S rRNA terdiri dari sembilan daerah hipervariabel, disebut sebagai V1-V9 sesuai dengan penamaan oleh Van de Peer *et al.* (1996), yang dipisahkan oleh sembilan daerah yang sangat terkonservasi (Fuks *et al.* 2018). Wilayah hipervariabel adalah fragmen di wilayah 16S rRNA di mana mutasi lebih sering terjadi di daerah ini, terlebih bisa terlihat pada aras spesies. Penelitian terdahulu untuk menganalisis keanekaragaman genetik bakteri dengan sekuens gen pengode 16S rRNA dilakukan oleh Dewi *et al.* (2015) yang menganalisis keanekaragaman genetik bakteri *Staphylococcus*.

Bakteri memiliki ukuran yang kecil dan rasio permukaan terhadap volume yang tinggi, serta memiliki keanekaragaman genetik tertinggi di antara organisme lain karena perubahan mikrogeografis atau temporal di lingkungan habitatnya (Levins, 2020). Keanekaragaman genetik diperlukan agar populasi mikroba dapat berevolusi dan mengatasi perubahan lingkungan (Caliskan, 2012). Dalam keanekaragaman gen yang tinggi juga terdapat gen-gen potensial yang tinggi. Oleh karena itu, pengetahuan

mengenai keanekaragaman genetik bakteri termofilik sangat berguna untuk konservasi sumber daya genetik serta dapat menyediakan suatu informasi dasar dalam aplikasi pengembangan bioteknologi selanjutnya.

Analisis gen pengode 16S rRNA menjadi salah satu metode yang dapat dimanfaatkan dalam penelitian identifikasi spesies bakteri serta evolusi molekulernya. Yang *et al.* (2017) menyatakan, analisis area 16S rRNA adalah metode yang lebih disukai untuk klasifikasi taksonomi bakteri karena mengandung sembilan daerah hipervariabel dengan keanekaragaman urutan yang signifikan antara spesies bakteri berbeda sehingga ilmuwan dapat memanfaatkannya untuk mengidentifikasi spesies (Chakravorty *et al.* 2007). Selain itu, region 16S rRNA juga dapat dimanfaatkan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik berdasarkan wilayah gen yang dilestarikan (*conserved*) dalam region 16S rRNA.

Identifikasi spesies bakteri dengan pendekatan lainnya seperti morfologi memiliki kelemahan. Mikroba berukuran sangat kecil dan keberadaan mikroba yang serupa membuat sulit untuk membedakan antara spesies yang berukuran mikroskopis. Menurut Yohandini *et al.* (2015) pendekatan secara morfologi juga memiliki keterbatasan untuk menemukan keanekaragaman yang luas dari komunitas mikroba di habitat aslinya. Namun, pendekatan morfologi diperlukan, karena penggunaan sekuensing region 16S rRNA bersama dengan analisis bioinformatika memungkinkan identifikasi isolat bakteri termofilik hingga ke tingkat spesies dan memperkuat hasil identifikasi morfologi (Suddin *et al.* 2019).

Bakteri termofilik kini intensif diteliti dalam penelitian dasar dan dikembangkan untuk aplikasi bioteknologi (Madigan *et al.* 2018). Aplikasi enzim dalam bidang bioteknologi memerlukan enzim yang tahan terhadap terhadap suhu tinggi. Enzim selulase, xilanase dan pektinase dari bakteri termofilik sudah digunakan dalam operasi bioteknologi seperti *biobleaching* pulp, produksi pakan, produksi gula yang dapat difermentasi dari limbah selulosa untuk biofuel, pemrosesan serat tanaman, dan pemurnian air (Chen & Jiang, 2018).

Pencarian bakteri termofilik indigen sumber air panas Semendo perlu dilakukan, mengingat potensi bakteri termofilik di bidang bioteknologi. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Mar'ah (2014) mengenai identifikasi bakteri termofilik asal Semendo menggunakan sekuens region 16S rRNA didapatkan empat isolat bakteri pendegradasi selulosa termofilik dari genus *Anoxybacillus* dan *Bacillus*. Namun sekuens yang didapat sebesar 300 pb sehingga hanya dapat mengidentifikasi bakteri sampai tingkat genus (Mar'ah, 2014). Oleh karena itu, identifikasi bakteri hingga tingkat spesies perlu dilakukan menggunakan sekuens gen pengode 16S rRNA.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bakteri termofilik pada dasarnya memiliki keanekaragaman genetik yang luas dalam domain Bacteria. Penelitian mengenai keanekaragaman genetik bakteri termofilik indigen sumber air panas Semendo belum dilakukan sehingga perlu dilakukan isolasi bakteri termofilik asal Semendo serta analisis keanekaragaman genetik, identifikasi, dan hubungan kekerabatannya.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Bersumber pada rumusan masalah, penelitian dilakukan dengan tujuan:

1. Mendapatkan isolat bakteri termofilik asal sumber air panas Semendo.
2. Menganalisis keanekaragaman genetik dan spesies dari bakteri termofilik asal Semendo.
3. Mengkonstruksi pohon filogenetik bakteri termofilik.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Isolat bakteri yang didapat pada penelitian dimaksudkan untuk melengkapi koleksi kultur mikroba yang dapat digunakan sebagai sumber enzim termostabil dan metabolit sekunder. Penelitian juga diharapkan dapat memberikan informasi keanekaragaman genetik dan spesies bakteri termofilik berdasarkan wilayah 16S rRNA yang ada di sumber air panas Semendo, Kabupaten Muara Enim, Provinsi Sumatera Selatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Mawgood, A. L. (2012). DNA Based Techniques for Studying Genetic Diversity. In (Ed.), Genetic Diversity in Microorganisms. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/33509>.
- Achtman, M., & Wagner, M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 431-440.
- Akbar, N., & Labenua, R., 2018. Keragaman genetik Ikan Cakalang (Katsuwonus pelamis) di Perairan Laut Maluku Utara. *Depik Jurnal*, 7(2): 164–176.
- Alzohairy, A. M. 2008. ClustalW: Widespread Multiple Sequences Alignment Program. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 7 (1): 81-82.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Aprilyanto, V. & L. Sembiring. 2016. *Filogenetika Molekuler: Teori dan Aplikasi*. Yogyakarta: Innosain.
- Artati, D. 2016. Sensitivitas Gel Red sebagai Pewarna DNA pada Gel Elektroforesis. *Buletin Teknik Litkayasa AkuakuLtur*, 11(1), 11-14.
- Asikin, S. 1979. *Dasar-Dasar Geologi Struktur*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Bahri, S. B. S., Wahyudi, A. T., & Mubarik, N. R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria of *Bacillus* sp. based on 16S rRNA sequence and amplified rDNA restriction analysis. *Microbiology Indonesia*, 3(1), 2-2.
- Bain, S. A., Barker, D., & Attwood, T. K. (2020). Bioinformatics: food detective—a practical guide. *F1000Research*, 9.
- Bansode, S. 2018. Advances in Genetics Research. *Stem Cell Research International J Biote Bioch*. 2 (3) : 1-5.

- Baxevanis, A. D., Bader, G. D., & Wishart, D. S. (Eds.). 2020. *Bioinformatics*. John Wiley & Sons.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizarachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D. and Sayers, E.W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Research*. 46 (D1): D41-D47.
- Bergstrom, D. E. (2001). Haplotype. In S Brenner & J. H. Miller (Eds). *Encyclopedia of Genetics*. (pp 911-912).
- Benardini, J. N., Vaishampayan, P. A., Schwendner, P., Swanner, E., Fukui, Y., Osman, S., & Venkateswaran, K. 2011. *Paenibacillus phoenicis* sp. nov., isolated from the Phoenix Lander assembly facility and a subsurface molybdenum mine. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(6), 1338-1343.
- Bleidorn, C. 2017. *Phylogenomics*. Springer Nature.
- Brown, A., dan Heidi S. 2015. *Benson's Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology Thirteenth Edition*. New York: McGraw-Hill Education. 481 hlm.
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community meta results. *Scientific Data*, 6(1), 1-14.
- Caliskan, M. 2012. *Genetic Diversity in Microorganisms*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Chang, J. M., Evan, W. F. and Javier, H. *et al.* (2021). Incorporating alignment uncertainty into Felsenstein's phylogenetic bootstrap to improve its reliability. *Bioinformatics*. 37(11): 1506-1514.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330-339.
- Chen, Z., Hui, P. C., Hui, M., Yeoh, Y. K., Wong, P. Y., Chan, M. C., & Chan, P. K. (2019). Impact of preservation method and 16S rRNA hypervariable region on gut microbiota profiling. *Msystems*, 4(1), e00271-18.



- Chen, G. Q., & Jiang, X. R. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 50, 94-100.
- Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., & Toohey-Kurth, K. 2020. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767-775.
- Derekova, A., Sjøholm, C., Mandeva, R., & Kambourova, M. 2007. *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria). *Extremophiles*, 11(4), 577-583.
- Desiliyarni, T., Suwanto, A., Suhartono, M. T., & Purwadaria, T. (1999). Genetic Diversity Analysis of Thermophilic Bacteria From Candradimuka Crater in Central Java Employing Pcr-rflp of 16s-rrna Gene. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, (14). 1-9.
- Dewata, D., Azhar, M., & Oktavia, B. 2016. Identifikasi Molekuler Gen 16S rRNA Isolat dan Bakteri Pendegradasi Inulin dari Rizosfer Umbi Dahlia. *Chemistry Journal of State University of Padang*, 5(2), 16-21.
- Dewi, P. M. P., Besung, I. N. K., & Mahardika, I. G. N. K. (2015). Keragaman spesies dan genetik bakteri staphylococcus pada ikan tuna dengan analisis sekuen 16s rrna. *Jurnal Veteriner*, 16(3), 409-415.
- Dharmayanti, I. 2011. Filogenetik Molekuler Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Evolusi. *Waetozoa*. 21 (1) : 1-10.
- Dilhari, A., Sampath, A., Gunasekara, C., Fernando, N., Weerasekera, D., Sissons, C., & Weerasekera, M. 2017. Evaluation of the impact of six different DNA extraction methods for the representation of the microbial community associated with human chronic wound infections using a gel-based DNA profiling method. *Amb Express*, 7(1), 1-11.
- Dirnawan, H., Suwanto, A., & Purwadira, T. 2000. Exploration of Extracellular-Hydrolytic Enzyme Producers Thermophilic Bacteria from Mount Pancar Hot Spring. Vol 7. (2)52-55.
- Ethica, S. N. 2019. *Pengantar Bioinformatika*. Yogyakarta: Deepublish.

- Fatchiyah, E. L., Arumningtyas, S., Widyarti, & Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga.
- Fatmaningtyas, T., Dominggas, M. H., Renwarin, & Matheus B. 2016. Analisis Kelayakan Sumber Air Panas sebagai Obyek Wisata Alam di Kabupaten Manokwari Selatan. *Jurnal Kesehatan Papuaasia*, 2(2), 1–17.
- Felsenstein, J. 2005. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Felske, A., A. Wolterink, R. Van Lis and A.D.L. Akkermans. 1998. Phylogeny of The Main Bacterial 16SrRNA Sequences in Drentse A Grassland Soils (The Netherlands).- *Appl. Environ. Microbiol.*64:871-879.
- Feng, Y. F., Zhang, X. X., Zhang, B., Liu, J. T., Wang, Y. G., Jia, D. L. & Kong, Z. Y. 2018. The geothermal formation mechanism in the Gonghe Basin: Discussion and analysis from the geological background. *China Geology*, 1(3), 331-345.
- Fincan, S. A., Enez, B., Özdemir, S., & Bekler, F. M. 2014. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate polymers*, 102, 144-150.
- Friedman, S. M. 1992. *Thermophilic Microorganisms. Encyclop.* (Vol. 4). Academic Press, Inc.
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y., & Shental, N. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1), 1-13.
- Furukawa, R., Toma, W., Yamazaki, K., & Akanuma, S. 2020. Ancestral sequence reconstruction produces thermally stable enzymes with mesophilic enzyme-like catalytic properties. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
- Ghodke, V. M., & Punekar, N. S. 2022. Environmental role of aromatic carboxylesterases. *Environmental Microbiology*, 24(6), 2657-2668.

- Gilbert, J. A., & Stephens, B. 2018. Microbiology of the built environment. *Nature Reviews Microbiology*, 16 (11): 661-670.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., Patten, C.L. 2010. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. (4 ed.). Washington, DC: ASM Press. Hlm. 117– 118.
- Goldman, E., & Green, L. H. (Eds.). 2015. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC press.
- Green, M. R., & Sambrook, J. 2019. Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-top100388.
- Hadi, A.U. 2014. Potensi dan Wilayah Kerja Pertambangan Panas Bumi di Indonesia. *Jurnal Ilmiah MTG*. 1(2):
- Hall, T., Biosciences, I., & Carlsbad, C. J. G. B. B. 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*, 2(1), 60-61.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229–1235.
- Harahap, M. R. 2018. Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1).
- Hartwell, L.H., Goldberg, M.L., Fischer, J.A., & Hood, L. 2018. *Genetics: From Genes to Genomes, Sixth Edition*. New York, NY : McGraw-Hill Education.
- Idris, A. B., Hassan, H. G., Ali, M. A. S., Eltaher, S. M., Idris, L. B., Altayb, H. N., & Hassan, M. A. 2020. Molecular phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences identified two lineages of helicobacter pylori strains detected from different regions in Sudan suggestive of differential evolution. *International Journal of Microbiology*, 2020.
- Ifandi, S., & Alwi, M. 2018. Isolation of Thermophilic Bacteria from Bora Hot Springs in Central Sulawesi. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10(2), 291-297.

- Inan, K., Belduz, A. O., & Canakci, S. 2013. *Anoxybacillus kaynarcensis* sp. nov., a Moderately Thermophilic, Xylanase Producing Bacterium. *Journal of Basic Microbiology*. 53(5): 410-419.
- Jabeen, F., Muneer, B., & Qazi, J. I. 2019. Characterization of thermophilic bacteria *Anoxybacillus rupiensis* and cultivation in agroindustrial wastes isolated from hot spring in Chakwal, Pakistan. *Pakistan J. Zool*, 51, 1243-1250.
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. 2017. The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 1-18). Academic Press.
- Janda, M., & Abbott, S. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 2761–2764.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, 10(1), 5029.
- Jumawita, Agustien, A., & Tjong, D. H. 2014. Karakterisasi Bakteri Amilo-Termofilik Obligat dari Sumber Air Panas Semurup, Sungai Penuh. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 3(3), 249–253.
- Khasa, Y. P., & Mohanty, S. 2021. Growth Physiology and Kinetics. In *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism* (pp. 137-179). Springer, Singapore.
- Kikani, B. A., Kourien, S., & Rathod, U. 2020. Stability and thermodynamic attributes of starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylase of *Anoxybacillus rupiensis* TS-4. *Starch-Stärke*, 72(1-2), 1900105.
- Kim, H. J., Joo, W. A., Cho, C. W., & Kim, C. W. 2006. Halophile Aldehyde Dehydrogenase from *Halobacterium salinarum*. *Journal of proteome research*, 5(1), 192-195.

- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladion, M.A., & Killian, D.J. 2018. *Concepts of Genetics Twelfth Edition*. Hoboken, New Jersey: Pearson Education.
- Ko, S. H., Borovska, P., & Gancheva, V. Optimization of multiple sequence alignment software clustalw. *PRACE Whitepaper*.
- Kusumaningsih, P. dan Gede, I. M. (2020). Analisis filogenetik bakteri *Serratia* sp. dan *Kurthia* sp. pada pindang tongkol (*Euthynnus affinis*). *Seminar Nasional Bioteknologi Universitas Dhyana Pura*. 64-69.
- Lama, L., Nicolaus, B., Di Donato, P., Poli, A., Toksoy, Oner, E., et al. (2009). A raw starch digesting -amylase from the thermophilic *Anoxybacillus amylolyticus*. Purification and characterization. *New Biotechnology*, 25, 91–92.
- Lebedinsky, A.V., Chernyh, N.A. dan Bonch- Osmolovskaya, E.A. 2007. Phylogenetic Systematics of Microorganism Inhabiting Thermal Environment. Russian: Biokhimiya.
- Lebonah, D. E., Dileep, A., Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Sreedevi, B and Pramoda, J. K. (2014). DNA Barcoding on Bacteria: A Review. *Advances in Biology Hindawi*. ID 541787. DOI: 10.1155/2014/541787.
- Levins, R. 2020. *Evolution in Changing Environments*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Librado, S. P., Rozas, L. J. A., Sánchez del Barrio, J. C., Messeguer Peypoch, X., & Rozas, R. (2010). DnaSP Version 5. DNA Sequence Polymorphism..
- Lingga, R., Budi, A., Reti, S., & Ina, M. 2021. Isolasi dan karakterisasi Bakteri Asal Sumber Air Panas Non-Vulkanik. *Bioedusains: Jurnal Pendidikan Biologi Dan Sains*, 4(2), 175–184.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270.
- Ludwig, W. and Klenk, H. P. (2001). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematic, in Boone, Castenholz and Garrity (Editors), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Volume 1, The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, Springer, New York, 49-65.

- Madigan, T., Bender, K. S., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. 2018. *Brock Microorganisms* 15th Global Edition (15th ed.). Pearson.
- Mahmudah, R., Baharuddin, M., & Sappewali. 2016. Identifikasi isolat bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng. *Al-Kimia*,4(1), 31–42.
- Maqsood, B., Basit, A., Khurshid, M., & Bashir, Q. 2020. Characterization of a thermostable, allosteric L-asparaginase from *Anoxybacillus flavithermus*. *International journal of biological macromolecules*, 152, 584-592.
- Mar'ah, H.A. 2014. Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Selulase Asal Semendo dengan Pendekatan Biologi Molekuler Berbasis Gen 16S-rRNA. *Skripsi*. Universitas Sriwijaya.
- Martin, R. 2020. *Gel electrophoresis: nucleic acids*. Garland Science.
- Mehta, D., & Satyanarayana, T. 2013. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In *Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology* (pp. 3-60). Springer, Dordrecht.
- Mehta, D., & Satyanarayana, T. 2016. Bacterial and archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1129.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. 2017. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolats as potential producers of thermostable enzymes. *International journal of microbiology*, 2017.
- Muharni, Juswardi, & Prihandayani, I. 2013. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Protease dari Sumber Air Panas Tanjung Sakti Lahat Sumatera Selatan. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Muharni. 2010. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Kitinase dari Sumber Air Panas Danau Ranau Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains.*, 06–09.
- Nazir, R., Rehman, S., Nisa, M., & ali Baba, U. 2019. Exploring bacterial diversity: from cell to sequence. In *Freshwater Microbiology* (pp. 263-306). Academic Press.

- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Noer, S. 2021. Identifikasi Bakteri Secara Molekular Menggunakan 16S rRNA. *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 1(1), 1–6.
- Nuritasari, D., Sarjono, P. R. ,& Agustina L. N. 2017. Isolasi Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Gedongsongo dengan Media Pengaya MB (Minimal Broth) dan TS (Taoge Sukrosa) serta Identifikasi Fenotip dan Genotip. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 20(2), 84–91.
- Octarya, Z., Syukur, S., & Purwati, E. 2011. Skrining dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Selulase dan Amilase dari Sumber Air Panas Bukit Kili Solok Sumatera Barat dengan Analisis Gen 16S rRNA. *Photon: Jurnal Sain dan Kesehatan*, 2(1), 37-44.
- Osawa, S., Su, Z. H., dan Imura, Y. (2004). *Molecular phylogeny and evolution of carabid ground beetles*. Springer Science & Business Media.
- Ovando-Chacon, S. L., Tacias-Pascacio, V. G., Ovando-Chacon, G. E., Rosales-Quintero, A., Rodriguez-Leon, A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Servin-Martinez, A. 2020. Characterization of thermophilic microorganisms in the geothermal water flow of El Chichón volcano crater lake. *Water*, 12(8), 2172.
- Pangastuti, A. (2006). Definisi spesies prokaryota berdasarkan urutan basa gen penyandi 16S rRNA dan gen penyandi protein. *Biodiversitas*, 7(3), 292-296.
- Pearson, W.R. 2014. BLAST and FASTA Similarity Searching for Multiple Sequence Alignment. In: Russell, D. (eds) *Multiple Sequence Alignment Methods. Methods in Molecular Biology*, vol 1079. Humana Press, Totowa, NJ.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Pradhan, B., Liedtke, J., Sleutel, M., Lindbäck, T., Zegeye, E. D., O´ Sullivan, K., & Remaut, H. 2021. Eisolatres Appendages: a novel pilus superfamily from the eisolatres of pathogenic Bacilli. *The EMBO Journal*, 40(17), e106887.

- Primrose, S.B. & Twyman, R.M. 2006. *Principles of Gene Manipulation and Genomics Seventh Edition*. International, Padstow, Cornwall : Blacwell Publishing.
- Raiyani, N. M., Georrg, J. J., Herma, T. H., & Singh, S. P. (2020, April). Designing and evaluation of metagenomics 16S rRNA gene primers. In *Proceedings of the National Conference on Innovations in Biological Sciences (NCIBS)*.
- Rinanda, T. 2011. Analisis sekuensing 16S rRNA di bidang mikrobiologi. . *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 11(3), 172–177.
- Rogers K. 2011. *New Thinking about Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing, Hlm. 132.
- Rosli, N. E., Ali, M. S. M., Kamarudin, N. H. A., Masomian, M., Latip, W., Saadon, S., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2022). Structure Prediction and Characterization of Thermostable Aldehyde Dehydrogenase from Newly Isolatl Anoxybacillus geothermalis Strain D9. *Microorganisms*, 10(7), 1444.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Saitou, N., dan Nei, M. 1987. The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylgenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4): 406 – 425.
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. 2021. Understanding the BLAST (Basic local alignment search tool) Program and a step-by-step guide for its use in life science research. *Quarterly Research Journal of Plant & Animal Sciences/Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 36(1).
- Sawitri, R. dan Takandjandji, M. (2012). *Inbreeding* pada Populasi Banteng (*Bos javanicus* d’Alton 1832) di Kebun Binatang Surabaya. *Buletin Plasma Nuftah*. 18(2): 84-94.
- Setlow, P. 2014. Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know. *J Bacteriol* 196: 1297–1305.



- Shahi, S. K., Samantha, N. F. and Ashutosh, K. M. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: The players involved and the roles they play. *Gut Microbes Journal*. 0(0): 1-9.
- Shahi, S. K., Zarei, K., Guseva, N. V., & Mangalam, A. K. 2019. Microbiota analysis using two-step PCR and next-generation 16S rRNA gene sequencing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*.
- Siliakus, M. F., van der Oost, J., & Kengen, S. W. 2017. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 21(4), 651-670.
- Singleton, P. 1999. *Bacteria in Biology, Biotechnology, and Medicine 5th Ed.* John Wiley and Sons Inc., NewYork.
- Sjafaraenan, S., Lolodatu, H., Johannes, E., Agus, R., & Sabran, A. 2018. Profil Dna Gen Follicle Stimulating Hormone Reseptor (Fshr) pada Wanita Akne dengan Teknik Pcr dan Sekuensing Dna. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*, 3(1), 1-11.
- Smith, M.H., R.K. Chesser. 1981. Rationale for conserving genetic variation of fish gen poll. *Ecology Bulletin of Stockholm*, 23: 119-130.
- Smith, M. H., & Chesser, R. K. (1981). Rationale for conserving genetic variation of fish gene pools. *Ecological Bulletins*, 13-20.
- Stover, N. A, dan Cavalcanti, A. R. O. 2017. Using NCBI BLAST. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley online library.
- Subari, A., Razak, A., & Sumarmin, R. 2021. Phylogenetic Analysis of Rasbora spp. Based on The Mithochondrial DNA COI Gene In Harapan Forest. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 89-94.
- Suddin, S., Mokosuli, Y. S., Marcelina, W., Orbanus, N., & Ardi, K. 2019. Molekul barcoding based 16S rRNA gene of Thermophilic bacteria from vulcanic sites, Linow Lake, Tomohon. In *Materials Science Forum* (Vol. 967, pp. 83-92). Trans Tech Publications Ltd.

- Sulandari, S. dan Zein, M. S. (2012). Mitochondrial DNA Variation of the Sumatran Elephant in Sumatera. *The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*. 19(2): 92-102.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tringe, S. G. and Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion Microbiology*. 11(5): 442-6.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, (1), 2-3.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., & Øvreås, L. 2000. Molecular biology and genetic diversity of microorganisms. *Journey to Diverse Microbial Worlds*, 43-57.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. 2018. *Microbiology: an introduction*. Pearson.
- Urbietta, M. S., Donati, E. R., Chan, K. G., Shahar, S., Sin, L. L., & Goh, K. M. 2015. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 633-647
- Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Orr, R. B. 2020. *Campbell Biology Twelfth Edition*. (Twelfth Edition.). Pearson.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 1996;24:3381–3391.
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Panjiar, N., Kumar, S., Saxena, A. K., & Suman, A. 2015. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Annals of microbiology*, 65(4), 1885-1899.
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, 8(2), e57923.

- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). 2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Wahyudi, A.T., Astuti, R.I., & Priyanto, J.A. 2021. *Metode Eksperimen dalam Genetika Bakteri*. Bogor: IPB Press.
- Wang, Y. and Qian P-Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 4(10):7401.
- Webster, G., Newberry, C. J., Fry, J. C., & Weightman, A. J. 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 155-164.
- Westermeier, R. 2016. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. John Wiley & Sons.
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17(1), 1-8.
- Yohandini, H., & Muharni, J. 2015. Isolation and phylogenetic analysis of thermophile community within Tanjung Sakti Hot Spring, South Sumatera, Indonesia. *Hayati J. Biosci.*, 22: 143-148.
- Yusoff, D. F., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Masomian, M., Ali, M. S. M., & Leow, T. C. 2020. Newly isolated alkane hydroxylase and lipase producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species involved in crude oil degradation. *Catalysts*, 10(8), 851.
- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayan, I. 2018. Teknik perancangan primer untuk sekuen Gen MDR-1 varian 1199 pada sampel buffy coat pasien anak dengan LLA. *JURNAL METAMORFOSA V*, 105-111.
- Yuwono, T. 2010. *Biologi Molekular*. Jakarta: Erlangga.

