

# DETEKSI KERAGAMAN SPESIES BAKTERI METANOGEN RUMEN SAPI MENGGUNAKAN KLONING GEN 16S rRNA DAN SEKUENSING

SHOFFIANA NOOR, HENDRO PRAMONO, SAEFUDDIN AZIZ

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jalan dr. Suparno 63 Purwokerto 53122

## ABSTRACT

Ruminants produce methane gas which contributes to enhanced greenhouse effect in the atmosphere. Cattle issued the highest methane during the fermentation of feed in the rumen. Methane gas produced by methanogen bacteria in carbohydrates anaerobic fermentation. Methanogen bacteria are difficult to obtain diversity information because difficult cultured. One technique can be used is molecular rRNA 16S gene cloning and sequencing. This study aims to determine the species diversity of methanogen bacteria in cattle's rumen using rRNA 16S gene cloning and sequencing technique by survey method. The results obtained 51 clones with 800 bp insert size length. The sequencing resulted 2 different sequences, ie 8-3L21 clone bacterium uncultured and BBS-12 clone methanogens rumen uncultured rRNA 16S gene partial sequence with 99% and 100% similarity. The Genus sequences for gene 1 and 3 were *Prevotella* (24%), *Clostridium* (1.5%), and other uncultured bacteria, whereas the 2 gene sequences of species was *Methanobrevibacter ruminantium* (21.83%), *M. millerae* (29.17%), *M. gottschalkii* (6.47%), *Methanospaera stadtmannae*, and *Methanobacterium alcaliphilum*. This research provides scientific information about cattle rumen methanogen bacteria species diversity which can be used as a basis for control of cattle rumen methanogen bacteria.

KEY WORDS: cattle rumen methanogens, rRNA 16S, gene cloning

Penulis korespondensi: SHOFFIANA NOOR | email: shoffianan@ymail.com

## PENDAHULUAN

Ternak ruminansia menghasilkan gas metan ( $\text{CH}_4$ ) yang berkontribusi terhadap akumulasi gas rumah kaca (GRK) di atmosfer. Produksi gas metan dari ternak ruminansia berkontribusi 95% dari total emisi metan dunia dan sekitar 18% dari total gas rumah kaca di atmosfer (Martin *et al.*, 2008). Ternak sapi mengeluarkan hampir 73% gas  $\text{CH}_4$  selama proses fermentasi pakan dalam rumen. Sedangkan kerbau dan domba masing-masing mengeluarkan gas metan 10% dan kambing 4% (US Environment Protection Agency, 1994). Kontributor emisi gas metan tertinggi di sektor peternakan berasal dari sapi potong, yaitu sekitar 65% dari emisi ternak ruminansia atau 59% dari total emisi hewan ternak (DITJENNAK, 2007; IPCC, 2006).

Emisi gas metan oleh ternak ruminansia dihasilkan melalui proses metanogenesis di dalam sistem pencernaan khususnya bagian rumen. Gas metan dihasilkan dari rumen sebesar 80-95% dan 5-20 % dihasilkan dari usus besar (Shiddieqy, 2009). Menurut Johnson dan Johnson (1995) dan Pelchen dan Peters (1998), gas metan yang dikeluarkan dari rumen mengindikasikan energi yang hilang dari tubuh ternak ruminansia dengan variasi 7-12% dari energi yang dikonsumsi. Gas metan dihasilkan dari fermentasi anaerob karbohidrat oleh bakteri penghasil metan (metanogen).

Bakteri metanogen berperan dalam mengubah asam-asam lemak dan alkohol menjadi metan dan karbondioksida (Speece, 1983). Bakteri metanogen dibagi menjadi dua, yaitu bakteri metanogen hidrogenotropik dan asetotropik. Bakteri metanogen hidrogenotropik mengubah hidrogen dan karbondioksida menjadi metan. Bakteri metanogen asetotropik mengubah asam asetat menjadi metan

dan  $\text{CO}_2$  (Mackie dan Bryant, 1984). Bakteri metanogen dikelompokkan menjadi tiga ordo, yaitu Methanobacteriales (contoh: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospaera*, *Methanothermobacter*, dan *Methylosphaera*), Methanomicrobiales (contoh: *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, dan *Methanococcoid*), dan Methanococcales (contoh: *Methanococcus*) (Vogels *et al.*, 1988). Bakteri metanogen dapat berupa kelompok bakteri gram positif dan gram negatif (Moss, 1993).

Bakteri metanogen bersifat anaerob obligat dan sulit sekali dikultur secara selektif. Hal ini karena pengetahuan mengenai kondisi alami bakteri metanogen masih kurang sehingga sulit untuk membuat media kultivasi yang sesuai. Selain itu, bakteri yang dapat tumbuh di media selektif jumlahnya sangat sedikit sehingga tidak dapat mencerminkan keragaman spesies (Amann *et al.*, 1995).

Salah satu teknik yang cukup akurat untuk mengetahui keragaman bakteri yang sulit sekali dikultur, yaitu menggunakan teknik kloning gen. Teknik molekuler lain yang dapat digunakan untuk menganalisis mikroba pada suatu sampel di antaranya adalah *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA), dan *Restriction Fragment Length Polymorfisme* (RFLP), dan *Fluorescence In Situ Hybridization Analysis* (FISH). Kloning gen merupakan proses perbanyakan fragmen gen target dengan mengintroduksi DNA rekombinan ke dalam suatu sel inang (Brooker, 2005). Teknik kloning gen memungkinkan ekstraksi DNA secara langsung dari lingkungan untuk dianalisis keragaman spesies maupun fungsinya (Streit dan Schmitz, 2004). Keunggulan dari teknik kloning gen adalah materi DNA bakteri yang terdapat di lingkungan dapat

langsung diekstraksi tanpa melalui proses penumbuhan pada media buatan terlebih dahulu (Lorenz dan Schleper, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian Necessian *et al.* (2005), bakteri metanogen ukuran 800 *bp* telah berhasil diklon dari sumber dasar hydrothermal. Riesenfeld *et al.* (2004) menyatakan bahwa gen resisten antibiotik aminoglycoside bakteri tanah ukuran 1,5 kb yang tidak dapat dikultur telah berhasil diklon dari sampel waduk. Fanani (2011) juga telah berhasil mengklon gen glikosida hidrolase dari sampel tanah menggunakan teknik kloning gen untuk degradasi biomassa.

Gen 16S rRNA digunakan dalam teknik kloning gen sebagai dasar melihat keragaman bakteri dalam suatu habitat (Schmeisser *et al.*, 2007). Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena bersifat universal dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme prokariot. Gen 16S rRNA adalah target utama yang digunakan untuk mengkarakterisasi bakteri metanogen dari sampel lingkungan. Gen 16S rRNA kekal antara spesies mikroba prokariotik seperti bakteri dan archaea, dengan sekuen berbeda banyak digunakan untuk identifikasi spesies. Gen 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan biasanya variatif (Stackebrandt dan Goebel, 1995).

Bakteri metanogen dideteksi awal dengan metode PCR gen 16S rRNA. Amplifikasi PCR adalah langkah penting pertama untuk memperbanyak DNA yang terdapat dalam jumlah rendah (Ahmed, 2006). Primer Met\_86f dan Met\_915r dirancang oleh Wright *et al.* (2004) dari sekuen gen 16S rRNA untuk amplifikasi bakteri metanogen. Susunan primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5'-GCT CAG TAA CAC GTG G-3' (Met\_86f) dan 5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3' (Met\_915r) untuk mendapatkan sekuen gen 16S rRNA dengan ukuran yang diinginkan yaitu 800 *bp*. Analisis gen 16S rRNA lebih mudah dibandingkan untuk definisi spesies dan keragamannya, sehingga dapat dirancang suatu primer universal untuk seluruh kelompok bakteri (Yun dan Ryu, 2005).

Pemilihan primer dapat mempengaruhi komposisi dari populasi metanogen (Skillman *et al.*, 2006). Penggunaan primer Met\_86f/Met\_1340r dan kombinasi Met\_21f/Met\_1340r oleh Wright dan Pimm (2006) dengan urutan 1200 dan 1300 *bp* tidak menghasilkan produk PCR. Primer Met\_86f/Met\_915r dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA secara parsial dengan menghasilkan fragmen sebesar 800 *bp* untuk mendeteksi bakteri metanogen dari rumen sapi (Zhou *et al.*, 2009). Primer Met\_86f/Met\_915r dapat mengidentifikasi spesies *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera*, *Methanoculleus*, *Methanomicrobium*, *Methanosarcina*, dan *Methanococcus* (Zhou *et al.*, 2011).

Jenis bakteri metanogen dari ordo Methanobacteriales adalah yang paling umum ditemukan dalam rumen sapi (Skillman *et al.*, 2004).

Berdasarkan penelitian Stadtman dan Barker (1951), hanya 7 spesies bakteri metanogen rumen sapi yang berhasil diidentifikasi dengan metode kultur independen, yaitu *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanomicrobium mobile*, dan *Methanosarcina barkeri*. Whitford *et al.* (2001) menyatakan bahwa terdeteksi 41 sekuen gen 16S rRNA dari rumen sapi. *Methanobrevibacter ruminantium* dan *Methanosphaera stadtmanae* adalah spesies paling dominan, sedangkan genus *Methanobrevibacter* yang paling sering terdeteksi pada rumen sapi.

Perumusan masalah yang dapat diambil dari latar belakang di atas, yaitu :

1. Bakteri metanogen rumen sapi dari spesies apa yang diperoleh menggunakan teknik kloning gen 16S rRNA dan sekuensing?
2. Kelompok bakteri metanogen rumen sapi mana yang paling banyak ditemukan?

Berdasarkan perumusan masalah tersebut, perlu dilakukan penelitian dengan tujuan :

1. Mengetahui keragaman spesies bakteri metanogen rumen sapi menggunakan teknik kloning gen 16S rRNA dan sekuensing.
2. Mengetahui kelompok bakteri metanogen rumen sapi yang paling banyak ditemukan.

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tentang keragaman spesies bakteri metanogen rumen sapi. Informasi tersebut dapat dijadikan sebagai dasar pengendalian bakteri metanogen rumen sapi.

## METODE

Penelitian ini dilakukan dengan metode survey pada sampel rumen dari 3 sapi potong yang diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH) di Mersi. Data yang diamati mencakup karakter molekuler berupa marka PCR. Marka tersebut diamplifikasi dengan satu pasang primer spesifik Met\_86f dan Met\_915r kemudian dielusi menggunakan *GeneJet™ Extraction Kit*. Amplifikasi marka PCR dilakukan menggunakan teknik kloning gen 16S rRNA kemudian disekuensing.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ukuran pita insert hasil kloning gen 16S rRNA, yaitu 800 *bp* dari amplifikasi dengan primer spesifik Met\_86f dan Met\_915r. Parameter yang diamati yaitu persentase similaritas sekuen gen 16S rRNA kedua sekuen berbeda bakteri metanogen rumen sapi.

Pengambilan Sampel menurut Tilley dan Terry (1963) dilakukan dengan cara memotong umen sapi yang diambil dari rumah pemotongan hewan (RPH) di Mersi. Termos yang dipakai untuk tempat cairan rumen sapi diisi dengan air panas sehingga suhunya mencapai 39°C kemudian ditutup. Ambil rumen sapi kemudian diperas dengan kain blacu dan dimasukkan ke dalam termos hangat. Air panas yang ada di dalam termos dibuang terlebih dahulu sebelum digunakan untuk tempat cairan rumen sapi.

DNA genom diisolasi dengan metode kit (*Xprep Plant DNA Mini Kit*) sesuai prosedur (Philekorea Technology, INC.) Amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR dilakukan pada mesin *termocycler* TC-5000. Reaksi PCR dibuat 3 *ependorf tube* dengan komposisi mix untuk total volume setiap *tube*

20 µl adalah 1 µl DNA produk ekstraksi, 1 µM primer Met\_86f, 1 µM primer Met\_915r, 2 mM dNTP, 2 mM bufer DNA Taq Polimerase, 0,3 U DNA Taq Polimerase, dan 12,7 µl akuabides steril.

*Running* PCR dilakukan selama 30 siklus pada kondisi pra-denaturasi dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 95°C 45 detik, *annealing* 56°C 30 detik, polimerisasi 72°C 1 menit, dan final polimerisasi 72°C 5 menit yang diprogram berdasarkan modifikasi Sambrook dan Russell (2001). Elektroforesis sebelumnya dilakukan dengan cara timbang 1% serbuk agarosa dalam 20 ml bufer TAE 1x dan setelah dipanaskan dicampur 2 µl EtBr. *Running* elektroforesis dilakukan pada voltase 100 volt selama 30 menit dengan komposisi 5 µl DNA produk PCR, 1 µl *loading dye*, dan 1 µl *DNA ladder* 100 bp.

Pita DNA dielusi dengan *GeneJet™ Gel Extraction Kit* sesuai prosedur kemudian dilakukan PCR dengan total volume setiap *tube* 20 µl dibuat dengan komposisi mix adalah 3 µl DNA produk elusi, 1 µM primer Met\_86f, 1 µM primer Met\_915r, 2 mM dNTP, 2 mM bufer DNA Taq Polimerase, 0,3 U DNA Taq Polimerase, dan 10,7 µl akuabides steril (Vogelstein dan Gillespie, 1979).

PCR dilakukan selama 30 siklus pada kondisi pra-denaturasi dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 95°C 1 menit, *annealing* 50°C 30 detik, polimerisasi 72°C 1 menit, dan final polimerisasi 72°C 5 menit. Elektroforesis sebelumnya dilakukan dengan cara timbang 1,5% serbuk agarosa dalam 20 ml bufer TAE 1x yang dicampur 2 µl EtBr setelah dipanaskan. *Running* elektroforesis dilakukan pada voltase 100 volt selama 30 menit dengan 5 µl DNA produk PCR elusi, 1 µl *loading dye*, dan 1 µl *DNA ladder* 100 bp.

Media LB (Luria-Bertani) terdiri dari *bacto®-tryptone*, *bacto®-yeast extract*, dan NaCl. Timbang 12,5 serbuk LB dalam 500 ml akuades steril. Media LA dengan ampicilin dibuat dengan cara timbang 3,75 gr agar ke dalam 250 media LB cair dan disterilisasi. Dinginkan media sampai 50°C sebelum menambah ampicilin sampai konsentrasi akhir 200 ppm (µg/ml). Tuang 15-20 ml media ke dalam cawan petri 85 mm. Biarkan agar memadat. Simpan pada suhu 4°C. Pembuatan dan komposisi larutan/*buffer* yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada tabel 2.

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5α dilakukan dengan metode CaCl<sub>2</sub> (Sambrook dan Russell, 2001). Ligasi vektor pGEM®-T Easy dengan sisipan gen digunakan enzim T4 DNA ligase (Promega, 2008). Reaksi ligasi sejumlah 10 µl terdiri atas 2x *rapid ligation buffer* T4 DNA ligase, 1 µl DNA vektor pGEM®-T Easy, 3 µl DNA produk yang telah dielusi, dan 3 unit T4 DNA ligase (3 unit/µl). Reaksi ligasi diinkubasi pada suhu 4°C selama 16 jam.

Transformasi DNA plasmid ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5α dilakukan berdasarkan Sambrook dan Russell (2001). Isolasi plasmid hasil seleksi klon dilakukan dengan metode kit (*GeneJet™ Plasmid Kit*), kemudian dilakukan PCR dibuat 3 *ependorf tube* dengan komposisi mix untuk total volume setiap *tube* 20 µl adalah 1 µl DNA produk isolasi plasmid, 1 µM primer promoter T7, 1 µM primer SP6, 2 mM dNTP, 2 mM bufer DNA Taq Polimerase, 0,3 U DNA Taq Polimerase, dan 12,7 µl akuabides steril.

PCR dilakukan selama 30 siklus pada kondisi pra-denaturasi dengan suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 95°C 1 menit, *annealing* 45°C 30 detik, polimerisasi 72°C 1 menit, dan final polimerisasi 72°C 5 menit. Timbang 1% agarosa 20 ml bufer TAE 1x yang dicampur 2 µl EtBr setelah dipanaskan. *Running* elektroforesis dilakukan pada voltase 100 volt selama 30 menit dengan 5 µl DNA produk isolasi plasmid. *Loading dye* dan *DNA ladder* 100 bp yang

digunakan sebanyak 1 µl. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *Dark Reader UVCL-Transilluminator*.

Sekuensing adalah pembacaan sekuen basa nukleotida DNA. Metode sekuensing yang digunakan adalah *automated DNA sequencing* dengan mesin *sequencer* dan ddNTP yang dilabeli pewarna fluoresens (Fairbanks and Andersen, 1999). *Automated DNA sequencing* meliputi tahapan *cycle sequencing*, purifikasi produk *cycle sequencing*, dan pembacaan sekuens (Applied Biosystem 2000).

*Cycle sequencing* adalah tahapan yang menggunakan siklus denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi sehingga masing-masing fragmen DNA memiliki label pewarna fluoresensi pada ddNTP di ujung 3'. Purifikasi bertujuan untuk menghilangkan pewarna fluoresensi berlebih pada produk *cycle sequencing* agar tidak mengganggu pembacaan sekuen. Alat *sequencer* mendeteksi fluoresensi dari empat pewarna berbeda yang digunakan untuk mendeteksi reaksi ekstensi A, C, G, dan T dengan metode elektroforesis kapiler. Hasil pembacaan diinterpretasikan oleh perangkat keras dan lunak komputer dalam bentuk grafik elektroferogram (Applied Biosystem 2000). Sekuensing dilakukan di First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia.

Sekuen *forward* dan *reverse* hasil sekuensing disatukan untuk mendapatkan sekuen lengkap gen 16S rRNA. Penyatuan sekuen dilakukan dengan bantuan *CrustalW* pada program *Bioedit* untuk mencari daerah *overlapping* dari kedua sekuen *forward* dan *reverse*, sehingga dapat menghasilkan satu set sekuen promoter lengkap. Analisis sekuen nukleotida menggunakan *Chromas Lite* (versi 2.1.1., Technelysium Pty Ltd, Australia) yang ditunjukkan pada grafik elektroferogram.

Sekuen gen hasil sekuensing (*query*) disejajarkan dengan basis data DNA pada GenBank (*subject*) menggunakan program BLASTN pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Hasil analisis BLASTN yang menunjukkan *subject* dengan persentase *similarity* terbesar ditentukan sebagai sekuen yang memiliki kekerabatan terdekat dengan sekuen *query*.

Tingkat *similarity* suatu sekuen DNA dapat dilihat melalui beberapa parameter hasil BLASTN, yaitu *bit score*, *expect value* (E), *identities*, dan *gaps*. *Bit score* merupakan nilai perhitungan statistik hasil perbandingan antara data sekuen *query* dan sekuen *subject*. Semakin tinggi nilai *bit score*, maka semakin tinggi nilai *similarity*. Nilai E merupakan jumlah sekuen pada *subject* yang tidak terkait dengan sekuen *query*. Semakin kecil nilai E, maka semakin tinggi tingkat kepercayaan terhadap kesamaan sekuen tersebut. *Identities* adalah persentase *similarity* antara sekuen *query* dan sekuen *subject*. *Gaps* menunjukkan jumlah kekosongan basa yang muncul dari keseluruhan sekuen yang dibandingkan (Hall, 2001).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

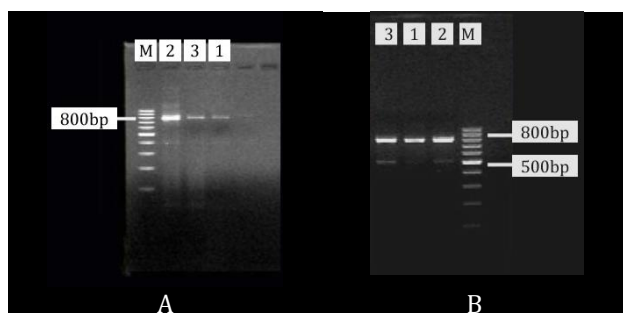
Kualitas DNA dapat diketahui melalui kemurnian berdasarkan perbandingan nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) pada pembacaan spektrofotometri. Berdasarkan hasil tersebut, kemurnian DNA produk ekstraksi 1, 2, dan 3 adalah 1.677, 1.692, dan 1.603. Menurut Sambrook *et al.* (1989), standar kemurnian DNA berkisar 1,8. Hasil pengukuran dalam penelitian ini menunjukkan semua DNA produk ekstraksi memiliki tingkat kemurnian yang baik dan tingkat kemurnian terbaik adalah pada DNA produk ekstraksi 2 (Tabel 1).



**Tabel 1.** Hasil pengukuran konsentrasi DNA produk ekstraksi secara kuantitatif menggunakan *nanophotometer*.

| Kode DNA produk ekstraksi | A230  | A260  | A280  | A320   | A260/A280 | A260/A230 | Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|---------------------------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|----------------------------------|
| 1                         | 0,041 | 0,022 | 0,016 | 0,006  | 1,677     | 0,457     | 8.000                            |
| 2                         | 0,061 | 0,024 | 0,015 | 0,002  | 1,692     | 0,373     | 6.500                            |
| 3                         | 0,014 | 0,005 | 0,003 | -0,001 | 1,603     | 0,4       | 3.000                            |

Proses amplifikasi gen 16S rRNA merupakan tahap awal dalam penelitian. Gen 16S rRNA diamplifikasi secara *in vitro* dengan teknik PCR untuk memperbanyak salinan spesifik gen target (Handoyo, D. dan Ari R., 2001). Reaksi PCR produk ekstraksi dan produk elusi yang divisualisasikan pada gel agarosa (1% dan 1,5%) berhasil mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA berukuran 800 *bp* secara spesifik (Gambar 1). Hasil visualisasi gel agarosa menunjukkan pita tunggal yang jelas, tebal, dan tidak *smear*. Hal tersebut menandakan bahwa DNA produk ekstraksi dan produk elusi memiliki kualitas yang baik karena tidak terlihat pola pita DNA yang terdegradasi. Hasil yang diperoleh pada penelitian sesuai dengan pernyataan Herison *et al.* (2003), bahwa kualitas DNA yang baik dan tidak terdegradasi pada hasil elektroforesis tidak menampakkan pola pita yang *smear*.

**Gambar 1.** Pola pita hasil amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer Met\_86f dan Met\_915r.

A. DNA Produk ekstraksi, B. DNA Produk elusi

Keterangan: M= DNA ladder 100 *bp*; 1, 2, 3 = DNA produk 1, 2, 3

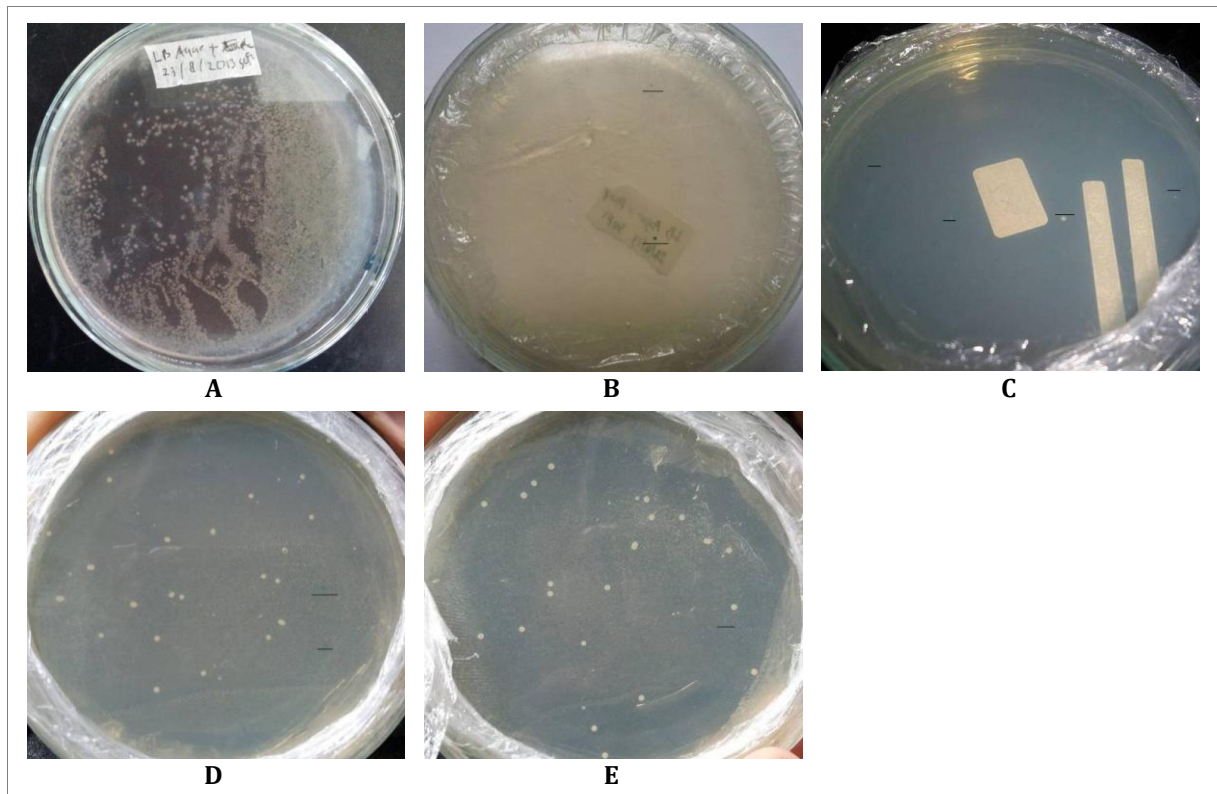
Pola pita menunjukkan bahwa target yang teramplifikasi merupakan gen spesifik metanogen dengan ukuran 800 *bp* yang terdapat pada gen 16S rRNA. Bakteri metanogen memiliki sekuen gen 16S rRNA unik yang telah digunakan untuk membedakan bakteri metanogen dari mikroba lain. Profil metanogen dalam rumen telah diidentifikasi dengan kombinasi berbeda dari primer spesifik metanogen yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen 16S rRNA secara parsial. Penggunaan primer Met\_86f/Met\_1340r dan Met\_21f/Met\_1340r oleh Wright dan Pimm (2006) dengan urutan 1.200 dan 1.300 *bp* tidak menghasilkan produk PCR. Primer Met\_86f/Met\_915r dapat mengamplifikasi gen 16S rRNA secara parsial dengan menghasilkan fragmen sebesar 800 *bp* untuk mendeteksi bakteri metanogen dari rumen sapi (Zhou *et al.*, 2009). Primer

Met\_86f/Met\_915r dapat mengidentifikasi spesies, *Methanospaera*, *Methanoculleus*, *Methanococcus*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, dan *Methanosarcina* (Zhou *et al.*, 2011).

Keragaman bakteri metanogen rumen sapi dapat dideteksi dengan metode kloning gen. Kloning gen merupakan proses perbanyakan fragmen gen target dengan mengintroduksi DNA rekombinan ke dalam suatu sel inang (Brooker, 2005). Molekul DNA rekombinan dibuat dengan menyisipkan fragmen DNA yang mengandung gen target ke dalam vektor (Brown, 2006). Penyisipan fragmen DNA ke dalam vektor untuk membentuk molekul DNA rekombinan melalui ligasi vektor dan gen target sisipan. Enzim ligase mengkatalisis proses perlekatan basa-basa nukleotida yang saling berkomplemen (Brooker, 2005). Ligasi vektor pGEM®-T Easy dengan sisipan gen target menggunakan enzim T4 DNA ligase (Promega, 2008). Reaksi ligasi yang menggunakan enzim T4 DNA ligase ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$  yang dipreparasi dengan metode  $\text{CaCl}_2$  (Brooker, 2005).

Pembuatan sel kompeten diawali dengan inokulasi kultur awal yang telah ditumbuhkan selama 12 jam ke dalam kultur sel kompeten. Menurut Ausubel *et al.* (1995), kultur sel kompeten ditumbuhkan pada suhu 37°C sampai sel bakteri memasuki awal fase logaritmik pertumbuhan. Kultur yang dipanen pada awal fase logaritmik memiliki kompetensi yang paling baik (Sambrook dan Russell, 2001). Sel bakteri pada fase tersebut mengalami pertumbuhan yang optimal dan aktif membelah sehingga memudahkan introduksi DNA asing (Ausubel *et al.* 1995). Kultur yang telah dipanen dengan sentrifugasi kemudian diberi perlakuan larutan  $\text{CaCl}_2$ . Menurut Old dan Primrose (2003), garam  $\text{CaCl}_2$  kemungkinan dapat menyebabkan perubahan struktur dinding sel yang meningkatkan pengikatan DNA pada bagian luar sel.

Proses transformasi vektor dari bagian luar ke dalam sel diinduksi oleh kejutan panas (*heat-shock*) dari suhu 0°C ke suhu 42°C selama 1 menit 45 detik. Kemungkinan molekul DNA yang telah menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma dengan pemberian *heat-shock* (Brown, 2006). Sel transforman yang telah diberikan *heat-shock* dikultur pada media LB sehingga sel kembali ke kondisi awal dan vektor dapat mengekspresikan gen resistensi antibiotiknya (Ausubel *et al.* 1995).



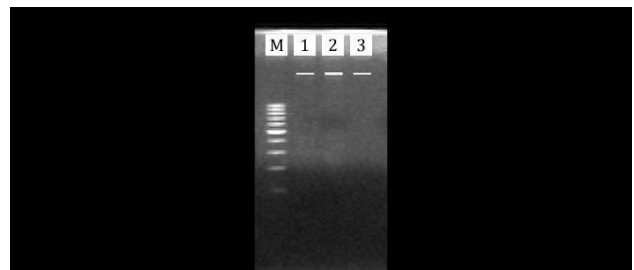
**Gambar 2.** Koloni biru dan putih hasil transformasi.  
a. *E. coli* DH5 $\alpha$ , b. Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (kontrol), c. Transforman 1, d. Transforman 2, e. Transforman 3.  
Keterangan : garis bawah = koloni biru; garis atas = koloni putih

Kultur *E. coli* DH5 $\alpha$  hasil transformasi disebar di atas media LB agar yang mengandung ampicilin yang sebelumnya kultur telah diberi X-gal dan IPTG. Koloni yang dapat tumbuh pada media ampicilin hanya sel bakteri yang berhasil mentransformasi vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy karena plasmid membawa sifat resistensi ampicilin bagi sel (Sambrook dan Russell, 2001). Kualitas sel kompeten dapat diketahui dengan nilai efisiensi transformasi. Menurut Davis *et al.* (1994), metode CaCl<sub>2</sub> memiliki nilai efisiensi transformasi optimal sekitar 10<sup>6</sup> cfu/ $\mu$ g DNA. Menurut Hanahan dalam Sambrook dan Russell (2001), nilai efisiensi transformasi dapat dipengaruhi oleh sejumlah faktor teknis, yaitu kemurnian reagen yang digunakan, kondisi pertumbuhan sel, dan kebersihan peralatan gelas.

Bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  yang telah ditransformasi dengan DNA plasmid hasil ligasi, kemudian diseleksi dengan media seleksi LB agar ampicilin, IPTG, dan X-gal. Media yang mengandung antibiotik ampicilin berfungsi untuk memilih DNA rekombinan yang terbentuk. Senyawa IPTG/X-gal pada media berfungsi untuk seleksi biru putih (Sambrook dan Russell, 2001).

Hasil penelitian memperlihatkan koloni yang tumbuh pada cawan petri 1, 2, dan 3 masing-masing hasil ligasi dengan rasio molar vektor : sisipan (1:3) berjumlah 2, 25, dan 24 koloni (Gambar 2). Hasil menunjukkan terbentuknya koloni putih > 60%. Menurut Promega (2008), terbentuknya koloni putih > 60% menunjukkan efisiensi transformasi yang tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses ligasi

berhasil dilakukan. Satu koloni putih dari masing-masing cawan dipilih secara acak kemudian diisolasi dengan *GeneJet™ Plasmid Kit*.



**Gambar 3.** Hasil isolasi plasmid  
Ket. : M=DNA ladder 100 bp; 1, 2, 3 = produk isolasi plasmid 1, 2, 3

Hasil visualisasi produk isolasi plasmid menghasilkan pita yang jelas (Gambar 3). Hal tersebut menunjukkan hasil positif bahwa koloni hasil transformasi yang diisolasi merupakan DNA rekombinan. Menurut Sambrook dan Russell (2001), hasil positif DNA rekombinan membawa sisipan fragmen gen target.

Ketiga produk isolasi plasmid kemudian di amplifikasi (PCR) dan disekuensing menggunakan primer promoter T7 dan SP6. Hasil sekuensing berupa elektroferogram, yaitu hasil analisis yang menampilkan grafik *peak* yang mewakili basa nukleotida hasil pembacaan mesin *sequencer*. *Peak* tersebut diterjemahkan menjadi basa-basa nitrogen untuk memudahkan analisis sekuen dengan program BLASTN. Elektroferogram menunjukkan sekuen parsial dari masing-masing sekuen gen, yaitu berupa

sekuen *forward* dan *reverse*. Hal tersebut terjadi karena proses reaksi sekuensing dilakukan sebanyak dua kali. Analisis sekuen nukleotida menggunakan *Chromas Lite* (versi 2.1.1., Technelysium Pty Ltd, Australia) yang ditunjukkan pada grafik elektroferogram. Pembacaan basa sekuen gen 1 dan 3 mencapai  $\pm 810$  bp dan sekuen hasil sekuensing yang memiliki *peak* yang jelas dan dapat diterjemahkan menjadi basa-basa nitrogen pada kedua sekuen *forward* dan *reverse* sekitar  $\pm 710$  bp sedangkan sekuen gen 2 sekitar  $\pm 760$  bp dengan panjang fragmen gen target sebesar  $\pm 800$  bp.

Hasil penyejajaran (*alignment*) terhadap sekuen *forward* dan *reverse* tersebut tidak menunjukkan adanya daerah *gap* (0%) pada gen 2, tetapi terdapat 1 *gap* pada gen 1 dan 3 sepanjang 1 basa pada basa acuan/*subject* 677 bp. Daerah *gap* merupakan daerah kosong pada hasil penyejajaran karena sekuen *forward* dan *reverse* tidak *overlap*. Proses penyejajaran tersebut salah satunya di *reverse* komplemen kemudian ditentukan sekuen dari gabungan *forward* dan *reverse* ditambah beberapa bagian *forward* dan *reverse* yang tidak tercover. Penyatuan sekuen dilakukan dengan bantuan program CrustalW pada Bioedit untuk mencari daerah *overlapping* dari kedua sekuen *forward* dan *reverse*, sehingga dapat menghasilkan sekuen lengkap.

Hasil penyejajaran menunjukkan terdapat beberapa perbedaan basa pada gen 1 dan 3 dengan sekuen acuan. Perbedaan tersebut juga terlihat pada *peak* elektroferogram. Gen 1 dan 3 memiliki 7 perbedaan basa sekuen *query* pada posisi 4, 13, 397, 574, 631, 646, dan 783, yaitu basa G, C, T, A, C, G, dan C digantikan oleh basa A, T, N, N, T, A, dan T pada sekuen acuan/*subject*. Perubahan basa yang terlihat pada hasil penyejajaran kemungkinan dapat terjadi karena basa menumpuk sehingga tidak dapat terbaca oleh mesin *sequencer*. Kesalahan pembacaan alat sekuensing dapat diklarifikasi dengan membandingkan *peak* yang terbentuk pada elektroferogram dengan sekuen acuan.

Hasil sekuensing dianalisis dengan program BLASTN pada situs NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) untuk melihat similaritas dengan sekuen acuan dari GenBank. Hasil BLASTN menunjukkan kesamaan gen 2 dengan sekuen klon gen 16S rRNA (Acc. No. JF951829.1). Sekuen *forward* dan *reverse* gen 1, 2, dan 3 menunjukkan nilai *identities* sebesar 99%, 100%, dan 99%. Hasil BLASTN menunjukkan bahwa sekuen gen 2 hasil sekuensing dan sekuen acuan gen 16S rRNA *uncultured* rumen metanogen BBS-12 (Acc. No. JF951829.1) memiliki similaritas yang tinggi dengan hasil pada tingkat spesies. Sekuen gen 1 dan 3 memiliki similaritas yang cukup baik dengan sekuen acuan gen 16S rRNA *uncultured bacterium clone 8-3L21* walaupun hanya pada tingkat genus (Acc. No. FJ682537.1).

Menurut Hall (2001), tingkat similaritas dapat ditentukan oleh nilai *identities*. Semakin tinggi nilai *identities* semakin menunjukkan kemiripan dengan

sekuen acuan pada GenBank. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fragmen gen 800 bp tersebut adalah bakteri metanogen. Hal tersebut membuktikan keberhasilan proses ekstraksi dan amplifikasi fragmen gen 16S rRNA.

Hasil analisis BLASTN diperoleh 2 sekuen yang berbeda. Sekuen dicocokkan dengan sekuen yang terdapat dalam NCBI. Berdasarkan NCBI, hasil sekuen gen 1 dan 3 diperoleh 1 sekuen klon yang sama pada tingkat genus, yaitu *Prevotella* 24%, *Clostridium* 1,5%, dan sisa bakteri *uncultured* lain (*Arthrobacter*, *Asteroleplasma*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Delftia*, *Eggerthella*, *Lactobacillus*, *Mitsuokella*, *Olsenella*, dan *Propionibacterium*). Hasil analisis sekuen gen 2 secara keseluruhan diperoleh 1 sekuen klon pada tingkat spesies, yaitu *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. millerae*, dan *M. gottschalkii* ditemukan masing-masing dengan persentase 21,83%, 29,17%, 6,47%, dan sisa pada *Methanospaera stadtmannae* dan *Methanobacterium alcaliphilum*. *Methanobrevibacter millerae* adalah spesies yang paling melimpah. Semua spesies tersebut termasuk ke dalam ordo Methanobacteriales. Hal tersebut sesuai pernyataan Skillman *et al.* (2004) bahwa jenis bakteri metanogen dari ordo Methanobacteriales adalah yang paling umum ditemukan dalam rumen sapi. Spesies dari genus *Methanobrevibacter* adalah yang paling sering terdeteksi pada rumen sapi (Whitford *et al.*, 2001).

Bakteri metanogen dalam rumen semakin sering diidentifikasi dari sekuen gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat *ubikuitus* dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Gen 16S rRNA memiliki beberapa daerah urutan basanya variatif. Urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua takson, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA. Biasanya jika derajat kesamaan urutan basa gen 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru (Stackebrandt dan Goebel, 1995).

Identifikasi bakteri berdasarkan gen 16S rRNA dengan metode molekuler sangat penting dalam mempelajari komunitas bakteri pada sampel lingkungan. Umumnya, bakteri metanogen dipelajari melalui isolasi dan karakterisasi melalui kultur, tetapi tidak semua jenis mikroba dapat dikultur (Reeve, 1994). Persentase jumlah mikroba yang dapat dikultur hanya sebesar 1% dari total populasi mikroba yang ada di alam (Suwanto, 1994). Kegagalan teknik kultivasi terutama disebabkan oleh kebutuhan nutrisi dan kondisi pertumbuhan bakteri sangat beragam (Felske *et al.*, 1998), padahal jenis mikroba yang belum dapat dikulturkan juga merupakan komponen utama dari komunitas mikroba secara keseluruhan sehingga teknik kultivasi tidak dapat dijadikan sebagai standar untuk mempelajari keragaman bakteri (Borneman *et al.*, 1996).



## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Diperoleh total 51 klon dengan panjang ukuran insert sebesar 800 bp. Genus yang diperoleh dari sekuen gen 1 dan 3 adalah *Prevotella*, *Clostridium*, dan bakteri *uncultured* lain (*Arthrobacter*, *Asteroleplasma*, *Bifidobacterium*, *Collinsella*, *Delftia*, *Eggerthella*, *Lactobacillus*, *Mitsuokella*, *Olsenella*, dan *Propionibacterium*) dengan masing-masing persentase sebesar 24%, 1,5%, dan sisa bakteri *uncultured* lain, sedangkan dari sekuen gen 2 diperoleh spesies *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. millerae*, dan *M. gottschalkii* ditemukan masing-masing dengan persentase 21,83%, 29,17%, 6,47%, dan sisa pada *Methanosphaera stadtmanae* dan *Methanobacterium alcaliphilum*.
2. Kelompok bakteri metanogen rumen sapi yang paling banyak ditemukan adalah spesies *Methanobrevibacter millerae* dan genus *Prevotella* dengan masing-masing persentase sebesar 29,17% dan 24%.

Perlu dilakukan upaya untuk mengurangi pembentukan gas CH<sub>4</sub> dari proses pencernaan pakan ruminansia atau upaya untuk meningkatkan bakteri metanogen untuk menghasilkan gas CH<sub>4</sub> yang lebih banyak untuk dimanfaatkan sebagai sumber energi alternatif dalam bentuk biogas. Pemanfaatan biogas diharapkan dapat menekan efek negatif gas CH<sub>4</sub> bagi lingkungan. Selain itu, data sekuen dapat digunakan untuk analisis filogenetik sehingga dapat diketahui hubungan kekerabatan antar spesies.

## DAFTAR REFERENSI

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Applied Biosystem. 2000. Automated DNA sequencing: chemistry guide. Applera Corporation, Foster City, hlm. 246.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A, Jansen K. 1995. *Current protocols in molecular biology*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons. Inc., Massachusetts 24(3): 1-9.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 2002. *Current protocol in molecular biology* 1. John Wiley and Sons Inc., Canada 26(8): 1-2.
- Borneman TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1996. *Biology of microorganism*. 7<sup>th</sup> ed. Prentice-Hall, New Jersey 7: 909.
- Brooker RJ. 2005. *Genetics: analysis and principles*. McGraw Hill Companies, Inc., Boston 26: 842.
- Brown TA. 2006. *Gene cloning and DNA analysis: An Introduction*. 5<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, Oxford 20: 386.
- Chromas Lite. 2013. Version 2.1.1., Technelysium Pty Ltd, Australia.
- Crustal W. 2012. Foster City. Ltd.
- Davis LG, Kuehl WM, Battey JF. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Appleton and Lange. Connecticut 12: 777.
- DITJENNAK. 2007. *Statistik peternakan*. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Fairbanks DF, Andersen WR. 1999. *Genetics: Continuity of Life*. Brooks/Cole Publishing Company, New York 19: 820.
- Fanani MZ. 2011. Eksplorasi novel gen glikosida hidrolase untuk degradasi biomassa: pendekatan secara metagenomik. Surabaya: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Felske T, Akrotanakul P, Nattanomsak S, Huntamai S. 1998. Larval habitats and distribution patterns of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse), in Thailand. *Southeast Asian J. Tropical Medical Public Health* 34(3): 529-535.
- GeneJet™ Plasmid Kit. USA. 2013.
- Hall BG. 2001. *Phylogenetic trees made easy: a how to manual for molecular biologist*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland 12: 179.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: Sambrook, J. S. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. J. Mol. Biol 166: 557-580.
- Handoyo D, Ari R. 2001. *Manipulation and expression of recombinant DNA: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Elsevier Academic Press 16: 151.
- Herison C, Rustikawati, Eliyanti. 2003. Penentuan protokol yang tepat untuk menyiapkan DNA genom cabai (*Capsicum sp.*). *Jurnal Akta Agrosia* 6(2): 38-43.
- IPCC. 2006. *Emission from Livestock and Manure Management. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories*. Ch. 10.
- Johnson KA, Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci* 73: 2483-2492.
- Lorenz K, Schleper A. 2002. Bioinformatics tools and guideline to PCR primer design. *Afr. J. Biotechnol.* 2(5): 91-95.
- Mackie AT, Bryant DA. 1984. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *AEM J.* 65(3): 1251-1258.
- Martin C, Doreau M, Morgavi DP. 2008. Methane mitigation in ruminants: from rumen microbes to the animal. In: Ur 1213, Herbivores Research Unit, Research Centre of Clermont-Ferrand-Theix. France: F-63122 St Genes Champanelle.
- Moss AR. 1993. *Methane Global Warming and Production by Animals*. Chalcombe Publications, Canterbury.
- NCBI. 2013. The BLAST sequence analysis tool, 1 November 2013.
- Nercessian O, Bienvenu N, Moreira D, Prieur D, Jeanthon C. 2005. Diversity of functional genes of methanogens, methanotrophs, and sulfate reducers in deep-sea hydrothermal environments. *Environ. Microbiol.* 7(1): 118-132.
- Old RW, Primrose SB. 2003. *Prinsip-Prinsip Manipulasi Gen: Pengantar rekayasa genetika*. Edisi ke-4. Terjemahan dari *Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering*. 4<sup>th</sup> ed, oleh Susilo H, Oorebima AD. Jakarta: UI Press 8: 446.
- Philekorea Technology INC. Xprep Plant DNA Mini Kit (RNase A Included). Gasan-dong, Geumcheon-gu, Seoul, Korea Selatan pp: 153-803.
- Promega. 2008. pGEM®-T Easy vector systems: technical manual 42: 30.
- Queen BJ. 2000. *The transformation lab: experiment using E. coli and pFluoroGreen*. MdBioLab hlm. 19.
- Reeve G. 1994. *Molecular biology of dengue viruses*. New York: CAB International 175-198.
- Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6(9): 981-989.
- Sambrook J, Fritsch EF, Manniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press 38(31): 9.
- Sambrook JS, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1-3. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: xxvii + 18.136 + A. 14. 1 + R. 22 + 1. 44 hlm.
- Shiddieqy CH. 2009. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and phytophthora infected avocado roots. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 129-136.
- Schmeisser S, Talamini A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. 2007. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type-1 nonstructural protein ns1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. of Clinical Microbiol.* 40(2): 376-381.
- Skillman LC, Evans PN, Naylor GE, Morvan B, Jarvis GN, Joblin KN. 2004. 16S Ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10: 277-285.
- Skillman LC, Evans PN, Strompl C, Joblin KN. 2006. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett. J. of Appl. Microbiol.* 42: 222-228.

- Smith KD, Valenzuela A, Vigna JL, Aalbers K, Lutz CT. 1993. Unwanted mutation in PCR mutagenesis: Avoiding the Predictable. *Genome Research* 2: 253-257.
- Speece D. 1983. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. pp: 217-237. *In* : J.P. Jouany (Ed.). *The Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Paris: INRA.
- Stackebrandt E, Goebel BM. 1995. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. of Systematic Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stadtman TC, Barker HA. 1951. Studies on the methane fermentation. Tracer experiments of fatty acid oxidation by methane bacteria. *J. Bacteriol.* 61: 67-80.
- Streit RD, Schmitz G. 2004. PCR core system: complete reagent systems for DNA amplification. *Promega Notes Magazine* 62: 5-8.
- Suwanto B. 1994. Computer programs for PCR primer design and analysis. *PCR cloning protocol*. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Humana Press, Inc. 19-30.
- Tan ND, Wanapat M, Uriyapongson S, Cherdthong A, Pilajun R. 2012. Enhancing mulberry leaf meal with urea by pelleting to improve rumen fermentation in cattle. *J. of Animal Sci.* 25(4): 452-461.
- Tilley JAM, Terry RA. 1963. Two-stag tecnique for the in vitro digestion of forage crops. *J. British Grussland Soe.* 18: 104.
- US EPA. 1994. International anthropogenic methane emission: estimates for 1990. EPA 230-R93-010. Washington DC: Office of Policy, Planning and Evaluation.
- Vogelstein B, Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619.
- Vogels GD, Hoffe WF, Stumm CK. 1982. Association of metanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 608-612.
- Whitford MF, Teather RM, Forster RJ. 2001. phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1: 5.
- Wright AD, Williams AJ, Winder B, Christophersen CT, Rodgers SL, Smith KD. 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1263-1270.
- Wright AD, Toovey AF, Pimm CL. 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12: 134-139.
- Yun MC, Ryu SM. 2005. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology Journal* 4(115): 1-16.
- Zhou M, Hernandez SE, Guan LL. 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *J. of Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6524-6533.
- Zhou M, McAllisterb TA, Guan LL. 2011. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *animal feed sci. and Technol.* 166-167: 76-86.