

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI DENGAN GEN 16S RRNA DARI BAKTERI ASOSIASI SPONS KELAS DEMOSPONGIAE DI PERAIRAN TULAMBEN BALI

Isolation and Identification with 16S rRNA Gene from Bacteria Associations of Sponges Class Demospongiae in the Waters of Tulamben Bali

Fitria Sari¹, Niniek Widyorini¹, Aninditia Sabdaningsih¹

¹Departemen Sumberdaya Akuatik, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Jawa Tengah – 50275, Telp/Fax. +6224 7474698

Email: fitriasari143@gmail.com, widyorinininiek@gmail.com, aninditiasabdaningsih@live.undip.ac.id

Diserahkan tanggal: 31 Juli 2021, Revisi diterima tanggal: 21 September 2021

ABSTRAK

Spons merupakan hewan Porifera yang hidup menetap dengan sistem *filter feeder*. Spons memiliki tubuh berongga, berpori-pori dan hidup menetap, memiliki hubungan asosiasi dengan mikroorganisme seperti bakteri yang dapat berperan dalam proses fiksasi nitrogen, nitrifikasi dan denitrifikasi serta menghasilkan senyawa bioaktif. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui banyaknya isolat bakteri dan melakukan identifikasi jenis bakteri asosiasi pada spons laut kelas Demospongiae dengan menggunakan metode identifikasi molekuler. Penelitian ini berlangsung pada November 2020 – Mei 2021 meliputi pengambilan sampel hingga analisis laboratorium. Isolasi bakteri asosiasi spons dengan menggunakan media Zobell agar yang mendapatkan 24 isolat. Uji pewarnaan Gram menghasilkan 11 isolat Gram positif dan 13 isolat Gram negatif. Identifikasi molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), menghasilkan data sekuens yang dianalisis BLAST untuk menunjukkan isolat B62A dan B92B memiliki tingkat homologi sebesar 99% dengan *Bacillus cereus* dan *Bacillus paramycoides*. Konstruksi pohon filogenetik dibuat menggunakan analisis *Neighbor-joining* dengan metode Kimura 2-parameter pada *software* MEGA X, sehingga memperoleh hasil B62A mirip dengan *Bacillus cereus* dengan nilai bootstrap 100 dan B92B berkerabat *Bacillus paramycoides* dengan nilai bootstrap sebesar 100. Kesimpulan dari penelitian ini adalah dari 24 isolat bakteri pada 3 sampel spons kelas Demospongiae, dengan 2 isolat bakteri yang diidentifikasi menggunakan gen 16S rRNA diketahui mendapatkan bakteri *Bacillus cereus* dan *Bacillus paramycoides* yang telah dibuktikan dengan analisis filogenetik.

Kata Kunci: *Bacillus cereus*; *Bacillus paramycoides*; Identifikasi Molekuler; Polymerase Chain Reaction (PCR); Spons.

ABSTRACT

Sponges are Porifera can that live permanently with a filter feeder system. Sponges have a hollow body, are porous and live sessile, have associations with microorganisms such as bacteria that can play a role in the process of nitrogen fixation, nitrification, and denitrification, and produce bioactive compounds. The purpose of this research is to determine the types of association bacteria in marine sponges using the molecular identification method. This research took place in November 2020 – May 2021 involve sampling until analysis laboratory. Isolation of sponge association bacteria using Zobell agar media which obtained 24 isolates. The Gram stain test resulted in 11 Gram-positive isolates and 13 Gram-negative isolates. Molecular identification using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method, resulted in sequence data analyzed by BLAST to show isolates B62A and B92B had a homology level of 99% with *Bacillus cereus* and *Bacillus paramycoides*. The phylogenetic tree construction was made using Neighbor-joining analysis with the Kimura 2-parameter method on MEGA X software, so that B62A results were similar to *Bacillus cereus* with a bootstrap value of 100 and B92B is related to *Bacillus paramycoides* with 100 bootstraps value. The conclusion of this study is that from 24 bacterial isolates in 3 samples of sponges from Class Demospongiae, 2 bacterial isolates identification with 16S rRNA to obtained *Bacillus cereus* and *Bacillus paramycoides* bacteria which have been proven by phylogenetic analysis.

Keyword: *Bacillus cereus*; *Bacillus paramycoides*; Identification of molecular; Polymerase Chain Reaction (PCR); Spons.

PENDAHULUAN

Perairan Tulamben merupakan salah satu perairan di Pulau Bali yang memiliki keanekaragaman hayati laut pada tingkatan genetik, spesies dan ekosistem yang tinggi, sehingga memiliki nilai konservasi (Puspita, 2017). Tulamben berada di wilayah Kecamatan Kubu, Kabupaten Karangasem, yang berkembang menjadi salah satu destinasi wisata di Pulau Bali (Sari *et al.* 2017). Kondisi lingkungan laut yang tenang dan air laut yang jernih menjadi salah satu faktor pendukung dan daya tarik serta target utama wisatawan datang ke wilayah ini untuk melakukan wisata selam. Hal ini diketahui bahwa kawasan tersebut memiliki kelimpahan organisme air jenis karang, spons, ikan serta dijadikan habitat bagi spesies ikan yang sering muncul adalah mola-mola, napoleon, penyu laut (Pratama *et al.*, 2020).

Hampir 75% jenis spons yang dijumpai di perairan merupakan kelas dari Demospongiae. Bentuknya yang asimetris, Demospongiae tumbuh pada berbagai ukuran kecil hingga lebih dari 2 meter. Jenis ini dapat ditemukan pada banyak lingkungan yang berbeda, dari lingkungan intertidal sampai abisal yang dalam dan dingin (Pratama, 2014). Spons menjadi salah satu hewan yang hidup menetap dan sebagian besar hidup di laut dengan sistem *filter feeder* (menyaring makanan) (Haedar *et al.* 2016). Hidupnya yang menetap dan menempel, spons sering ditemukan di perairan yang cukup dalam, berarus tenang dan sedikit terkena sinar matahari. Spons dikenal sebagai penghasil senyawa bioaktif. Spons berperan dalam siklus karbon, silikon dan nitrogen serta melakukan asosiasi dengan organisme lain dimana spons memiliki peran sebagai produsen primer dan sekunder dalam penyediaan mikrohabitat (Haris *et al.*, 2019).

Kelimpahan spons yang ada di perairan dimanfaatkan sebagai fiksasi nitrogen. Fiksasi nitrogen tidak hanya terjadi pada organisme prokariota yang telah hidup bebas di laut dan sedimen, tetapi juga pada mikroorganisme laut yang berasosiasi dengan inang invertebrata seperti spons. Semua proses biogeokimia nitrogen dapat berperan dalam kehidupan spons

termasuk fiksasi nitrogen, nitrifikasi dan denitrifikasi (Voogd *et al.* 2015). Besarnya potensi dari mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons membuat peneliti tertarik menggali lebih jauh manfaat yang diperoleh spons tersebut dengan mengisolasi dan identifikasi jenis bakteri tersebut melalui pendekatan molekuler, sehingga dapat diduga jenis bakteri tersebut dan perlunya eksplorasi terhadap isolat bakteri yang diperoleh. Penggunaan teknik molekuler untuk identifikasi suatu organisme mempunyai keunggulan yang lebih akurat, cepat dan mampu mencakup keseluruhan mikroba. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui banyaknya isolat bakteri dan identifikasi jenis bakteri asosiasi pada spons laut dengan menggunakan metode identifikasi molekuler.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode yang sangat cocok digunakan untuk melakukan penelitian dengan cara mendeskripsikan, menjelaskan dan merumuskan suatu yang akan diteliti. Menurut Guntur *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa metode yang menggambarkan keadaan atau suatu kejadian di daerah disebut metode deskriptif.

A. Penentuan lokasi pengambilan sampel

Pemilihan lokasi penelitian pada perairan Tulamben berdasarkan referensi bahwa daerah tersebut berpotensi besar pada biota air yang melimpah. Metode yang digunakan dalam penentuan lokasi pengambilan sampel dengan metode *purposive sampling*. Metode pengambilan sampel menggunakan metode *purposive sampling*, yaitu pengambilan yang didasarkan oleh suatu keperluan dan pertimbangan tertentu dengan teknik pengambilan secara acak (Hutami *et al.* 2017). Sampel spons laut diambil dari perairan Tulamben Bali, daerah tersebut merupakan salah satu wilayah yang dikenal sebagai tempat diving. Pengambilan sampel spons laut didapatkan pada perairan dasar dengan kedalaman 15-20 meter.



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

Pengambilan sampel spons dilakukan di tiga titik yang sudah dianggap dapat mewakili wilayah perairan Tulamben (Gambar 1). Titik 1 terletak pada 8°16'39,50"S dan 115°35'51,18"E tepat di perairan Batu niti. Titik ke-2 terletak 8°16'30,41"S dan 115°35'38,23"E, lebih ke barat laut hanya bergeser sekitar 100meter dari titik pertama. Selanjutnya titik ke-3 pada 8°16'20,73"S dan 115°35'32,38"E.

B. Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel spons dilakukan menggunakan pisau atau cutter, pada masing-masing titik sampling mencari spons yang memiliki kelimpahan yang cukup banyak kemudian di ambil atau dipotong bagian kecil dan dimasukkan kedalam falcon. Sampel dimasukkan ke dalam *cool box* yang berisi *dry ice*. Parameter yang diukur secara *insitu* yaitu suhu, salinitas pH, dan kedalaman pada setiap titik sampling.

C. Analisa Laboratorium

Sterilisasi alat

Alat-alat yang akan digunakan untuk pengujian harus dalam keadaan steril, sehingga alat harus dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *autoclave* suhu 121 °C. Cawan petri yang akan digunakan harus dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas atau plastik. Erlenmeyer, tabung reaksi yang berisi larutan atau media harus ditutup dengan aluminium foil dan dibungkus plastik.

Pembuatan media

Media yang digunakan adalah Zobell dengan komposisi peptone, yeast dan agar sesuai kebutuhan penggunaan. Media ditambahkan air laut kemudian dihomogenisasi dengan *hotplate magnetic stirrer* sampai media mendidih. Media yang telah homogen di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C. Media dituang ke dalam cawan petri steril sampai mengeras dan disimpan.

Isolasi dan purifikasi bakteri

Tahap isolasi dan penanaman bakteri dilakukan dengan pengkayaan sampel spons (*enrichment*). Sebanyak kurang lebih 1gram sampel spons ditumbuk menggunakan mortar & pastel sampai halus dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi 25 mL aquades dan campuran media zobell yang sudah steril dengan suhu 121°C. Shaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi yang berisikan 9 mL air laut steril yang diberi kode 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} . Sampel hasil *enrichment* diambil 1 mL ke tabung reaksi 10^{-1} vortex sampai tercampur. Kemudian pengenceran berseri dilakukan dengan memindahkan 1 mL dari 10^{-1} ke tabung reaksi selanjutnya atau 10^{-2} . Hal yang sama dilakukan ke tabung reaksi 10^{-3} dan 10^{-4} dengan masing masing nya di *vortex* selama 5 detik. Penanaman bakteri dengan menggunakan metode tuang atau *pour plate*, metode dengan menuangkan sampel bakteri dan media Zobell yang masih cair secara bersamaan. Setelah penanaman bakteri hingga menunggu sampai media mengeras dan diinkubasi selama 24 jam (sampai bakteri tumbuh dengan sempurna). Purifikasi dilakukan untuk memisahkan dalam 1 cawan petri yang tumbuh

beberapa bakteri dipindahkan ke media baru, 1 cawan untuk 1 bakteri. Purifikasi dengan menggunakan metode streak atau goresan yang dibagi menjadi 4 kuadran. Setelah diinkubasi 24 jam dilihat koloni yang tumbuh hasil purifikasi diidentifikasi menurut ukuran, bentuk, warna dan elevasi.

Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan dilakukan dengan isolat bakteri terfiksasi menggunakan jarum ose dan digoreskan ke gelas objek selanjutnyaditeteskan beberapa larutan antara lain: ungu kristal (Gram A) diteteskan mengenai isolat dan didiamkan selama 1 menit. Larutan yodium (Gram B) diteteskan dan didiamkan selama 1 menit. Alkohol (Gram C) diteteskan tunggu 30 detik kemudian dicuci dengan akuades. Safranin (Gram D) diteteskan dan didiamkan selama 2 menit. Hasil pewarnaan Gram yaitu Gram positif akan berwarna ungu karena mempertahankan zat ungu kristal sedangkan gram negatif akan berwarna merah karena adanya pengaruh dari safranin yang lebih kuat.

Identifikasi molekuler

Tahapan identifikasi molekuler yang pertama adalah ekstraksi DNA, dengan metode chelex, 3 ose kultur bakteri dimasukkan dalam microtube yang berisi 250 µL 10% *chelex*. Microtube tersebut kemudian divortex selama 20 detik, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik, selanjutnya dipanaskan dalam suhu 95°C selama 45 menit, kemudian divortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Cairan bagian atas atau supernatan dimasukkan dalam microtube baru steril, supernatan merupakan DNA yang siap untuk digunakan dalam proses PCR. Simpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C (Pertiwi *et al.*, 2015).

Amplifikasi DNA dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dengan menggunakan master mix PCR untuk sampel satu adalah MyTaq Red mix 12,5 µL, Primer 27F 1 µL, primer 1492 1 µL, ddH₂O 8,5 µL dan DNA template sebanyak 2 µL. Protokol PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: *initial denaturation* 95°C selama 3 menit, *denaturation* 94°C selama 45 detik, *annealing* 54°C selama 1 menit, *extention* 72°C selama 1 menit, kemudian 35 siklus dengan *final extention* 72°C selama 10 menit dan suhu akhir 4°C dengan waktu tak terbatas (Mardiana *et al.*, 2020). Sampel kedua dengan menggunakan protocol mix PCR yang berbeda guna untuk mengetahui ketepatan penggunaan primer. Mix PCR antara lain GoTaq Green 12,5 µL, Primer 8F 1 µL, Primer 1492R 1 µL, ddH₂O 8,5 µL dan DNA tamplate sebanyak 2 µL. Protokol PCR yang digunakan untuk primer ini adalah *initial denaturation* 95°C selama 2 menit, *denaturation* 95°C selama 40 detik, *annealing* 50°C selama 40 detik, *extention* 72°C selama 40 detik, kemudian 37 siklus dengan final *extention* 72°C selama 15 menit dan suhu akhir 4°C (Rangian *et al.*, 2018).

DNA yang telah di amplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarose 0,8%. Sampel yang sudah teramplifikasi diambil sebanyak 3 µL dan dicampurkan dengan 2 µL *loading dye* dan dimasukkan

kedalam sumur atau lubang gel. Salah satu lubang atau sumur di awal diberi dengan 2 μL DNA ladder. Elektroforesis dilakukan dengan aliran tegangan listrik sebesar 100 *volt* dengan waktu 30 menit. Hasil akan berupa gambar DNA yang bergerak dari kutub negatif ke kutub positif pada gel agarose hasil elektroforesis (Fatmawati *et al.*, 2013).

Produk PCR yang telah berhasil divisualisasi selanjutnya dikirimkan ke PT. Genetika Science (Jakarta, Indonesia) untuk dilakukan penentuan sekuens 16S rDNA. Hasil sekuensing DNA, diolah dengan menggunakan aplikasi MEGA X kemudian dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

D. Konstruksi pohon filogenetik

Hasil sekuens yang berhasil diolah kemudian digunakan untuk mencari sekuens yang serupa pada *Gen Bank*. Data-data sekuens yang serupa yang diperoleh dari *GenBank* kemudian disejajarkan menggunakan program CLUSTALW. Pohon filogenetik dibuat dengan menggunakan software MEGA X. urutan tersebut kemudian dibandingkan dengan spesies lain yang dicari melalui taksonomi pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan metode Neighbor-Joining (Sabdaningsih *et al.*, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

A. Gambaran umum lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di daerah perairan Tulamben Kecamatan Kubu, Kabupaten Karangasem, Pulau Bali. Perairan yang memiliki luas wilayah $\pm 2.915,127$ Ha. Tulamben merupakan wilayah timur pada Pulau Bali, dekat dengan selat Lombok. Perairan ini terdapat beragam jenis biota air laut yaitu ikan, karang, spons, tunicate, bintang laut, nudibranch. Pengambilan sampel spons dibantu oleh *diver* dengan menggunakan perahu *boat* untuk menuju titik sampling.

B. Parameter lingkungan perairan

Tabel 1. Hasil pengukuran parameter lingkungan perairan.

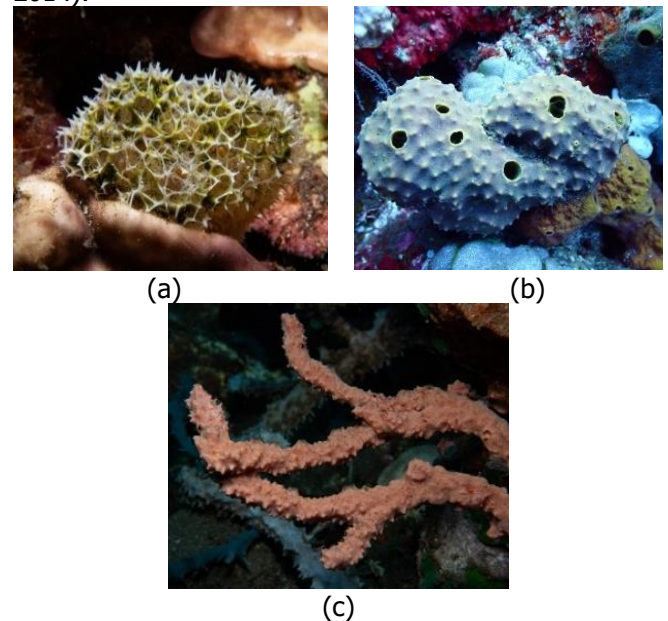
Titik	Kedalaman (m)	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Salinitas (ppt)
1	>5	29,5	7,63	35
2	>5	31	7,45	34
3	>5	31,4	7,43	34

Berdasarkan tabel 1, diketahui bahwa pengukuran yang dilakukan adalah kedalaman, suhu permukaan, pH dan salinitas. Kondisi lingkungan perairan Tulamben Bali dapat diketahui berdasarkan hasil pengukuran, kedalaman perairan Tulamben tergolong cukup dalam, melebihi 5meter, dimana titik sampling berada ± 100 meter dari daratan. Suhu

permukaan perairan berkisar 29,5-31,4 $^{\circ}\text{C}$ pada titik 1 dilakukan pada pukul 9 pagi sehingga suhu permukaan perairan paling rendah karena cahaya matahari yang masih sedikit menyinari perairan. Pengukuran pH pada ke tiga titik hampir sama, yaitu berkisar pH 7,43-7,63 sesuai dengan baku mutu pada KepMenLH dengan kisaran 7,0-8,5, sehingga pH air laut berada pada kondisi baik (Tanto dan Kusumah, 2016). Nilai salinitas berkisar antara 34-35 ppt, secara umum nilai salinitas bertambah tinggi seiring dengan bertambahnya kedalaman suatu perairan.

Isolasi dan pengenceran

Sampel yang digunakan ada 3 yaitu kode B4, B6, dan B9 sesuai pada Gambar 2. Pengambilan sampel telah mematuhi prosedur dari Pemerintah Provinsi Bali dengan dikeluarkannya surat izin rekomendasi penelitian Nomor 070/2605/IZIN-C/DISPMPPT oleh Kepala Dinas Penanaman Modal dan PTSP Provinsi Bali pada 19 November 2020. Masing-masing sampel diambil berdasarkan titik sampling. Sampel B4 memiliki ciri-ciri tubuh spons berwarna kuning kehijauan dengan duri-duri kecil berwarna putih setiap pucuknya yang tidak beraturan. Spons B4 ditemukan pada kedalaman 7-10m perairan Tulamben. Diduga bahwa berdasarkan ciri-cirinya sampel B4 merupakan spons jenis *Ulosa* sp. B6 merupakan spons yang memiliki ciri-ciri tubuhnya bentuk bulat tidak beraturan, terdapat rongga-rongga dan berwarna hijau ke merah muda. Spons ini sesuai dengan ciri-ciri dari spesies *Ircinia* sp. Sampel kode B9 berwarna jingga kecoklatan dengan memiliki tekstur yang halus hingga keras berbentuk seperti batang. Diduga mirip dengan jenis *Clathria reinwardti*. Ketiga spesies tersebut termasuk kedalam daftar kelimpahan spons yang ada di perairan Indonesia (Suharsono, 2014).



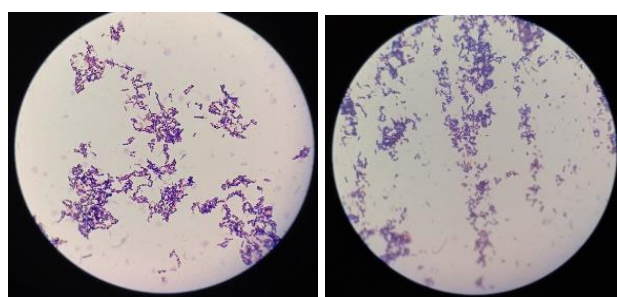
Gambar 2. Sampel (a). B4, (b) B6, (c) B9

Pengamatan morfologi pada setiap isolat bakteri yang ditumbuhkan untuk mengetahui karakteristik setiap isolat, dan dilakukan purifikasi. Pada 18 isolat yang telah dianalisa secara kasat mata atau penglihatan langsung, masing-masing memiliki bentuk dan ukuran

yang berbeda. Hal ini dapat diartikan bahwa pada setiap isolat memiliki banyak jenis bakteri yang ada, sehingga perlu dipisahkan untuk mengetahui spesies secara murni sehingga menghasilkan 24 isolat bakteri yang berbeda-beda dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Pengamatan morfologi isolat bakteri.

No	Kode	Ukuran	Warna	Bentuk	Margin	Elevasi
1	B4.2A	Besar	Kuning muda	Circular	Undulate	Flat
2	B4.2B	Sedang	Kuning muda	Circular	Ciliate	Flat
3	B4.2C	Kecil	Kuning muda	Circular	Undulate	Flat
4	B4.3A	Kecil	Kuning muda	L-Form	Entire	Flat
5	B4.3B	Besar	Kuning muda	Circular	Undulate	Flat
6	B4.3C	Besar	Kuning pucat	Flamentous	Undulate	Flat
7	B4.3D	Sedang	Kuning muda	Irregular	Undulate	Flat
8	B4.4A	Besar	Kuning muda	Irregulae	Undulate	Convex
9	B4.4B	Besar	Putih	Circular	Entire	Convex
10	B4.4C	Kecil	Putih	Circular	Entire	Convex
11	B4.4D	Sedang	Putih	Circular	Ciliate	Flat
12	B6.2A	Besar	Kuning pucat	Circular	Entire	Flat
13	B6.2D	Titik	Kuning pucat	Filiform	Undulate	Convex
14	B6.3A	Kecil	Kuning pucat	L-Form	Entire	Convex
15	B6.3B	Besar	Kuning pucat	Circular	Undulate	Flat
16	B6.3C	Besar	Kuning pucat	Circular	Entire	Flat
17	B6.3D	Besar	Kuning keputihan	L-Form	Entire	Convex
18	B6.4B	Kecil	Putih	Circular	Entire	Flat
19	B6.4C	Titik	Putih	L-Form	Entire	Convex
20	B6.4D	Titik	Kuning pucat	Circular	Entire	Flat
21	B6.4E	Sedang	Kuning pucat	Circular	Entire	Flat
22	B9.2B	Besar	Putih pucat	Circular	Undulate	Convex
23	B9.3C	Sedang	Putih pucat	L-Form	Entire	Convex
24	B9.4A	Kecil	Kuning pucat	Circular	Undulate	Convex



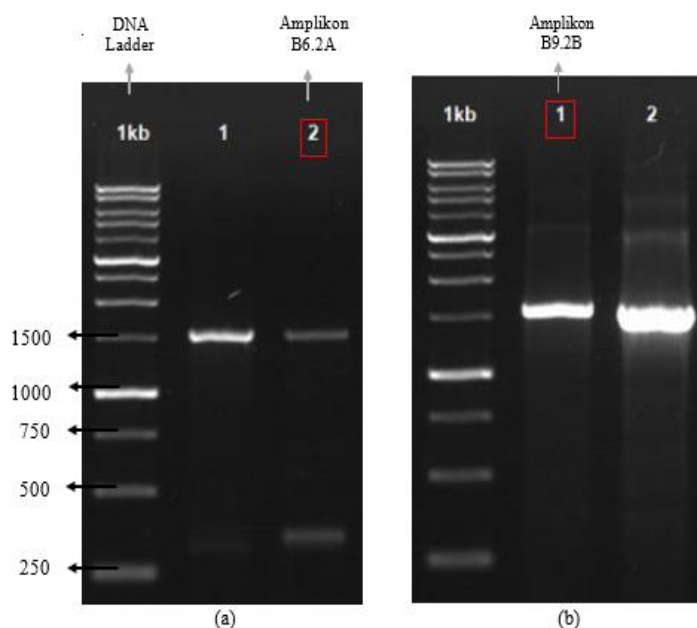
(a) (b)

Gambar 3. Hasil uji pewarnaan Gram sampel (a) B62A dan (b) B92B

Berdasarkan hasil uji pewarnaan Gram yang dilakukan terhadap 24 sampel, telah didapatkan dua sampel B62A dan B92B yang merupakan hasil paling jelas. Kedua sampel memiliki ciri berwarna ungu (Gram positif) berbentuk basil.

Identifikasi molekuler

Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi PCR sampel DNA bakteri B6.2A dengan menggunakan primer 8F dan 1492R selanjutnya isolat B92B dengan menggunakan primer 27F dan 1492R yang menunjukkan pita DNA yang berukuran 1500 bp.



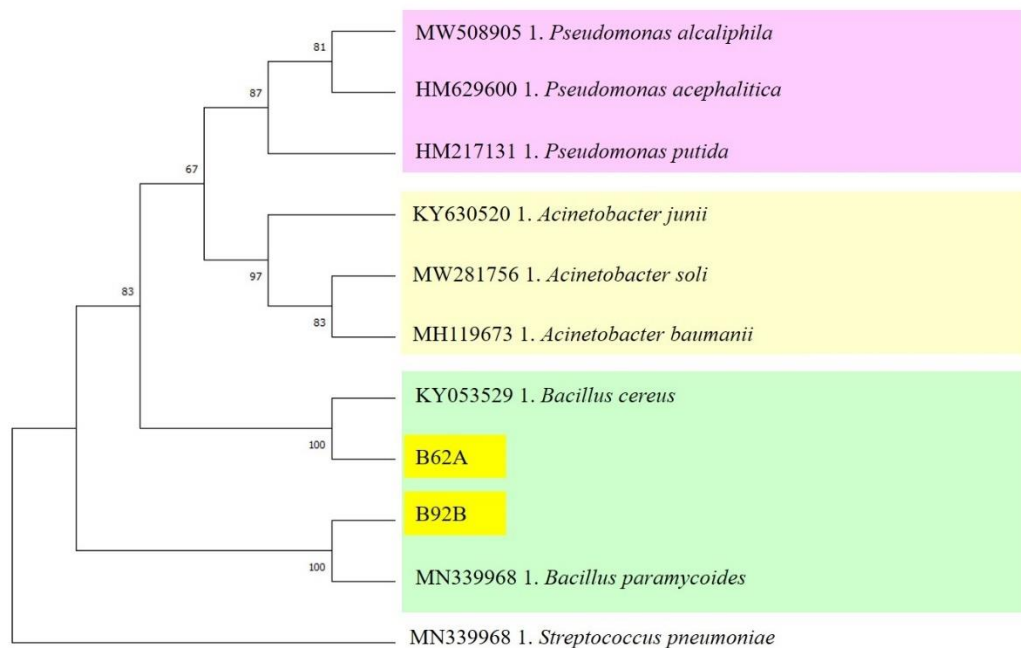
Gambar 4. Hasil amplifikasi PCR sampel DNA bakteri (a) B62A dan (b) B92B

Tabel 3. Hasil Blast sampel DNA bakteri B62A dan B92B

Species	Max Score	Total Score	Query cover	E value	Percent ident
<i>Bacillus cereus</i> strain IAM 12605 16S	1485	1485	100%	0.0	99,75%
<i>Bacillus paramycooides</i> strain 2883 16S	1249	1249	100%	0.0	99,28%

Hasil sekuens diolah dengan menggunakan software MEGA X. Berdasarkan tabel 3. homologi diatas diperoleh dengan menggunakan analisis BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online dengan

mengakses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Berdasarkan tabel hasil homologi tersebut menunjukkan bahwa identifikasi bakteri B62A tingkat homologi sebesar 99,75% terhadap *Bacillus cereus* strain IAM 12605 ribosomal RNA *partial sequence* dengan *Max score* dan *Total score* yaitu 1485, *Query coverage* mencapai 100%, *E-value* bernilai 0, dan *Percent ident* sebesar 99,75%. Selanjutnya isolat B92B memiliki kemiripan homologi sebesar 99,57% terhadap *Bacillus paramycooides* strain 2883 16S ribosomal RNA, *partial sequence* dengan *Max score* dan *Total score* yaitu 1249, *Query coverage* mencapai 100%, *E-value* bernilai 0, dan *Percent ident* sebesar 99,28%.



Gambar 5. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik isolat B62A dan B92B

Pohon dikonstruksi dengan metode *Neighbor-joining* dan analisis *bootstrap* (1000 *replicates*) dengan jarak genetika Kimura-2-Parameter. Pembuatan pohon filogenetik guna untuk menunjukkan adanya pengelompokan antara spesies yang didapatkan dengan spesies lain dengan tingkatan kekerabatan terdekat hingga terjauh.

Pembahasan

Parameter lingkungan perairan

Berdasarkan keempat pengukuran parameter lingkungan yang dilakukan memiliki hubungan yang saling berkaitan satu sama lain. Kecerahan, kedalaman, pH, suhu dan salinitas merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas dari bakteri. Spons merupakan organisme air yang memiliki habitat menempel disubstrat dan berada di perairan yang cukup dalam, semakin dalam suatu habitat maka semakin berkurang sinar matahari yang didapatkan oleh beberapa bakteri. Sinar matahari dapat merusak sel

bakteri karena adanya pengaruh sinar ultraviolet dan umumnya merusak sel bakteri yang tidak memiliki pigmen fotosintesis. Menurut Umami (2019), bakteri memerlukan nilai pH berkisar antara 6,5-7,5. Umumnya asam memiliki pengaruh buruk terhadap pertumbuhan bakteri. Perairan Tulamben memiliki potensi yang baik untuk bakteri tumbuh dan berkembang. Selain itu bakteri yang berasosiasi pada spons merupakan sumber yang sangat baik untuk aktivitas enzim ekstraseluler seperti amilase, protease, lipase. Suhu dan salinitas memiliki hubungan dengan kedalaman, dimana semakin bertambah kedalaman suatu perairan maka nilai salinitas bertambah maka kadar garam yang tinggi. Sedangkan penurunan nilai suhu seiring dengan bertambahnya kedalaman. Salinitas pada permukaan perairan Tulamben tergolong cukup tinggi, karena tidak terdapat pencampuran antara masa air tawar dan air laut sehingga nilai salinitas tetap tinggi (Sidabutar *et al.*, 2019).

Isolasi bakteri asosiasi spons

Penelitian dilakukan dengan pengayaan sampel, hal ini bertujuan untuk peningkatan nutrisi dan pertumbuhan bakteri yang akan diisolasi. *Enrichment* dilakukan selama 24 jam *shaker* dengan kecepatan 120 rpm, setelahnya dilakukan isolasi dan pengenceran bertingkat 10^{-1} sampai 10^{-4} yang ditumbuhkan pada media Zobell laut agar, media tersebut digunakan karena spons merupakan organisme air laut dan media Zobell biasa digunakan untuk bakteri yang hidup pada habitat bersalinitas tinggi atau laut (Setyati *et al.*, 2016). Pada penumbuhan isolat bakteri yang digunakan pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dengan metode duplo, yaitu dua cawan petri untuk setiap pengenceran. Total isolat bakteri dari tiga sampel adalah 18 petri, pada masing-masing sampel terdapat 6 isolat bakteri.

Pewarnaan Gram isolat bakteri dari sampel spons dilakukan untuk membantu mengidentifikasi bakteri yang dikelompokkan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif. Berdasarkan hasil pengecatan Gram dapat dilihat bahwa dari 24 isolat yang diujikan, 11 isolat bakteri tergolong Gram positif yaitu B42A, B42B, B43A, B43B, B43C, B44A, B62A, B62D, B63C, B64B, B92B dan 13 isolat Gram negatif yaitu B42C, B43D, B44B, B44C, B44D, B63A, B63B, B63D, B64C, B64D, B64E, B93C, B94A dengan bentuk basil (batang). Bakteri Gram positif memiliki kemampuan dalam mengikat kristal violet lebih kuat dari safranin sehingga bakteri akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif lebih mengikat safranin sehingga berwarna merah. Isolat bakteri yang berhasil penentuan Gram lebih banyak Gram negatif, karena pada umumnya bakteri yang hidup di laut memiliki bentuk basil dan bersifat Gram negatif. Bentuk basil merupakan bakteri yang memiliki flagel digunakan sebagai alat gerak yang sangat aktif (Ginting *et al.*, 2019).

Identifikasi molekuler

Proses identifikasi molekuler terdapat 3 proses utama yang diterapkan dalam penelitian sebagai dasar yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis serta sekuensing dan analisis data. Tahap awal ekstraksi DNA bakteri ini dilakukan agar terjadi pemisahan antara DNA dengan komponen sel lainnya, sehingga murni hanya benang benang DNA saja. Ekstraksi DNA dengan menggunakan chelex 10% berguna untuk mempercepat kinerja dalam pemisahan benang serta membutuhkan waktu yang singkat sehingga praktis dan ekonomis untuk digunakan. Chelex 10% selain cepat mampu mengurangi kemungkinan *sample to sample contamination* (Sutrisno *et al.* 2013). Pada proses ekstraksi membutuhkan pengaturan suhu untuk memecahkan dinding sel sehingga DNA keluar dari dalam sel. Suhu yang digunakan penelitian ini adalah 95°C selama 45 menit. Metode ekstraksi menggunakan chelex juga memiliki kekurangan dan mempengaruhi dalam tahap selanjutnya, yaitu DNA yang dihasilkan pada supernatan relatif sedikit selain itu juga hasilnya kurang stabil selama proses penyimpanan dengan rentang waktu yang lama (Marwayana, 2015).

Berdasarkan hasil yang diperoleh Gambar 3. identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan

isolat bakteri B6.2A dan B92B. Kedua isolat bakteri ini dipilih karena memiliki karakteristik mikroskopis pada uji pewarnaan yang sangat jelas. Keduanya mempunyai hasil pengamatan uji Gram berwarna ungu (Gram positif) dengan mempunyai koloni yang besar dan berbentuk circular. Gram positif dipilih karena untuk melakukan eksplorasi lebih lanjut dengan kata lain setelah isolat teridentifikasi dapat dikembangkan untuk kepentingan lain seperti aktivitas antibakteri, antivirus, probiotik. Pemilihan Gram positif juga dilihat dari sifatnya yang cenderung tidak pathogen dibanding dengan kelompok Gram negatif, sehingga dapat mengetahui bakteri yang tidak berbahaya atau menimbulkan penyakit pada spons.

Percobaan penggunaan Master mix dan primer untuk kedua sampel yang telah dipilih untuk isolat B62A, menggunakan master mix GoTaq®Green 12,5 µL. Master mix ini mempunyai komposisi berupa Taq DNA *Polymerase*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, MgCl₂, dan *buffer*. Master mix GoTaq®Green memiliki zat aditif betain yang tidak dapat mengubah warna GoTaq®Green atau mempengaruhi pewarna lain. Primer 8F (5'-AGAGTITGATCCTGGCTA-3') dan 1492R (5'TACCTTACGACTT-3') merupakan pasangan primer non universal tetapi memiliki kecocokan yang bagus dan memiliki ukuran pita sekitar 1500bp. Isolat B92B yang sudah siap diamplifikasi dengan menggunakan PCR master mix yaitu MyTaq™ Red Mix Bioline 12,5 µL. MyTaq™ Mix sangat direkomendasikan untuk semua standar PCR. Master mix ini memiliki kombinasi yaitu DNA *polymerase* dan *system buffer* yang memberikan amplifikasi PCR dengan hasil tinggi melalui bermacam-macam template PCR. Selain itu sifat MyTaq yang efisien mampu memberikan hasil yang sangat baik dalam kondisi PCR yang cepat. Selanjutnya primer universal yang digunakan adalah primer yang biasa digunakan karena merupakan gen 16S rDNA yang memiliki ukuran sekitar ±1500bp yaitu primer 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Menurut Mardiana *et al.* (2020), primer 27F dan 1492R digunakan untuk sekuensing basa nukleotida yang dapat menghasilkan urutan basa secara menyeluruh. Primer yang digunakan masing-masing 1 µL; DNA template 2 µL; dan ddH₂O 8,5 µL sehingga total 25 µL pada tube PCR.

Proses amplifikasi PCR berhasil sehingga mampu dideteksi lanjutan dengan elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarose 0,8% yang dilarutkan dalam buffer TAE dengan 400 A dan tegangan 100 V selama 30 menit, sehingga pita DNA tertempel pada gel. Gel yang telah mengandung pita DNA kemudian di amati menggunakan UV doc akan muncul pita DNA pada urutan baris 1500 bp. Hasil yang bagus akan muncul pita DNA yang tebal dan dapat lanjutkan proses identifikasi dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk dilakukan sekuensing. Kedua isolat menunjukkan pita DNA yang sedikit samar dan kurang jelas dan berada pada panjang basa yang cukup rendah 813bp dan 691bp. Hasil tersebut dapat dikatakan kurang bagus, beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil tersebut diantaranya kualitas dan

kuantitas sampel DNA. Selain itu, kurangnya ketelitian peneliti dalam proses ekstraksi DNA dan amplifikasi PCR yang kemungkinan adanya ketidakcocokan primer yang digunakan (Wehantouw *et al.* 2016).

Berdasarkan hasil sekuens yang diterima diolah menggunakan *software* MEGA X selanjutnya dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) secara online pada website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hasil yang didapatkan pada program BLAST dari bakteri B62A yaitu *Bacillus cereus* strain IAM 12605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence dan isolat B92B adalah *Bacillus paramycoides* strain 2883 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. *Bacillus cereus* memiliki kemiripan yang paling tinggi dan sesuai karena memiliki nilai *Max Score* dan *Total Score* sama besarnya yaitu 1485 dan *Bacillus paramycoides* 1262, keduanya memiliki *Query Coverage* mencapai 100%, *E-value* 0, *Percent Ident* 99,75% untuk *Bacillus cereus* dan 99,28% untuk *Bacillus paramycoides*. Isolat B62A dan B92B dengan tingkat homologi atau kemiripan mencapai sebesar 99%, sehingga hasil tersebut dapat dikatakan sesuai karena mendekati sempurna.

Pohon filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik pada Gambar 4. menunjukkan bahwa isolat B62A berkerabat dekat dengan *Bacillus cereus* dengan memiliki nilai bootsrap 100. Hasil ini dapat dikatakan bagus karena sudah mencapai 100% sehingga terbukti bahwa identifikasi sesuai. Sedangkan bakteri B92B mempunyai kekerabatan dengan spesies *Bacillus paramycoides* dengan nilai bootstrap sebesar 100. Kedua isolat memiliki tingkat kekerabatan dengan spesies yang bagus. Hasil ini dapat dikatakan baik atau stabil karena memiliki nilai mencapai 100% dan dikatakan tidak stabil apabila nilai bootstrapnya dibawah 70% (Abdullah *et al.* 2018). *Streptococcus pneumoniae* merupakan kelompok bakteri dengan kekerabatan yang paling jauh yang dapat disebut sebagai outgroup, atau bahkan tidak memiliki hubungan dengan kedua isolat, sehingga memiliki posisi paling bawah atau terjauh dalam pohon filogenetik.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian yang telah dilakukan mengenai adalah hasil isolasi bakteri pada 3 sampel spons adalah 24 isolat bakteri yang ditemukan mendapatkan 11 bakteri Gram positif dan 13 bakteri Gram negatif dan hasil identifikasi molekuler dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada kedua isolat bakteri B62A dan B92B diketahui mendapatkan bakteri jenis *Bacillus cereus* dan *Bacillus paramycoides*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Universitas Diponegoro yang telah mendanai sebagian kegiatan laboratorium melalui Program Penelitian Kolaborasi

Indonesia (PPKI) Tahun 2021 dengan nomor kontrak: 117-01/UN7.6.1/PP/2021.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., M. Nurilmala, A. S. Sari, dan A. M. Jacob. 2018. *Mini-COI Barcodes* Sebagai Penanda Molekuler Untuk Ketertelusuran Label Pangan Berbagai Produk Olahan Ikan Sidat. *JPHPI*, 21 (2): 377 – 384.
- Fatmawati, Y., A. Purwantoro dan P. Basunanda. 2017. Keragaman Morfologi dan Molekuler Empat Kelompok Kultivar Jagung. *Vegetetika*. 6(3): 50-64
- Ginting, E.L., L.Rangian., L.L.Wantania dan S. Wullur. 2019. Isolasi Bakteri Symbion Alga Merah dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(2): 394-400
- Guntur, G., A.T. Yanuar., S.H.J. Sari, dan A. Kurniawan. 2017. Analisis Kualitas Perairan Berdasarkan Metode Indeks Pencemaran di Pesisir Timur Kota Surabaya. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir, dan Perikanan*. 6(1): 81-89.
- Haedar., B. Sadarun dan R.D. Palupi. 2016. Potensi Keanekaragaman Jenis dan Sebaran Spons di Perairan Pulau Saponda Laut Kabupaten Konawe. *Sapa Laut*. 1(1): 1-9
- Haris, A., Nurafni., D.N. Lestari dan M. Hasania. 2019. Keanekaragaman dan Komposisi Jenis Sponge (Porifera: Demospongiae) di *Reef Flat* Pulau Barranglompo. *Journal of Fisheries and Marine Science (JFMarSci)*. 3(1): 26-36
- Hutami, G. H., M. R. Muskananfolo dan B. Sulardiono. 2017. Analisis Kualitas Perairan pada Ekosistem Mangrove Berdasarkan Kelimpahan Fitoplankton dan Nitrat Fosfat di Desa Bedono Demak. *Journal Of Maquares*, 6(3): 239-246.
- Mardiana, N. A., T. Murniasih, W. D. Rukmi, dan J. Kusnadi. 2020. Potensi Bakteri Laut sebagai Sumber Antibiotik Baru Penghambat *Saccharomyces aureus*. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 21 (1): 49 – 56
- Marwayana, O.N. 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) dari Sampel Jaringan Otot. *Oseana*. 11(2): 1-9
- Pertiwi, N.P.D., I.G.N.K. Mahardika dan N.L. Watiniasih. 2015. Optimasi Amplifikasi Dna Menggunakan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (Dottyback) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *Jurnal Biologi*. 19(2): 1-5
- Pratama, F. 2014. Distribusi dan Kelimpahan Sponge diperairan Pulau Karammasang Kabupaten Polewali Mandar: Keterkaitan dengan Terumbu Karang dan Oseanografi Perairan. [SKRIPSI]. Universitas Hasanuddin. Makassar
- Pratama, G.I.P., I.G. Hendrawan., I.W.G.A. Karang dan A. Chappuis. 2020. Karakteristik Vertikal Salinitas dan TDS di Perairan Amed dan Tulamben, Karangasem, Bali. *Journal of Marine Research and Technology*. 3(1): 47-58

- Puspita, N.A. 2017. Kajian Kesesuaian Wisata Selam dan Snorkeling di Perairan Tulamben, Karangasem, Bali. [SKRIPSI]. Universitas Udayana. Bali
- Rangian, L., E.L. Ginting., S. Wullur., E. Kaligis., S. Tilaar dan R. Tumbol. 2018. Amplifikasi Isolat Bakteri Sf1 Symbion Spons *Facaplysynopsis* sp. dari Perairan Tongkeina, Sulawesi Utara. Jurnal Ilmiah Platax. 6(2): 77-82
- Sabdaningsih, A., O. Crisnawati, M. T. Sibero, M. Aini, O. K. Radjasa, A. Sabdono, dan A. Trianto. 2019. Anti MDR *Acinetobacter baumannii* of *The Sponges-Associated Fungi from Karimunjawa National Park*. *AAFL Bioflux*, 12 (5): 1970 – 1983.
- Sari, E.T.P., T. Gunaedi, dan E. Indrayani. 2017. Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dengan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*). Jurnal Biologi Papua. 9(2): 37-42.
- Setyati, W.A., A.S. Habibi., Subagiyo., A. Ridio., Nirwani dan R. Pramesti. 2016. Skrining dan Seleksi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Ekstraseluler Sebagai Agen Bioremediasi Bahan Organik dan Biokontrol Vibriosis Pada Budidaya Udang. Jurnal Kelautan Tropis. 19(1): 11-20
- Sidabutar, E.A., A. Sartimbul dan M. Handayani. 2019. Distribusi Suhu, Salinitas dan Oksigen Terlarut Terhadap Kedalaman di Perairan Teluk Prigi Kabupaten Trenggalek. *Journal of Fisheries and Marine Research*. 3(1): 46-52
- Suharsono. 2014. *Biodiversitas Biota Laut Indonesia*. Pusat penelitian Oseanografi-LIPI. Jakarta: 418 hlm.
- Tanto, T.A dan G. Kusumah. 2016. Kualitas Perairan Teluk Bungus Berdasarkan Baku Mutu Air Luat pada Musim Berbeda. *Maspari Journal*. 8(2): 135-146
- Umami, S.S. 2019. Karakterisasi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim Protease dari Perairan Sekotong Lombok Barat. Jurnal Sains dan Pendidikan Biologi (Celebes Biodiversitas). 2(2): 22-31
- Voogd, N.J. De., D.F.R. Cleary., Polonia, A.R.M and N.C.M. Gomes. 2015. *Bacterial Community Composition and Predicted Functional Ecology of Sponges, Sediment and Seawater from the Thousand Islands Reef Complex, West Java*. *FEMS Microbiology Ecology*. 91(4): 1-12
- Wehantouw, A., E. Ginting., S. Wullur. 2016. Identifikasi Sirip Ikan Hiu yang Didapat dari Pengumpul di Minahasa Tenggara menggunakan DNA Barcode. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. 1(1). 62-68.