

LAPORAN PENELITIAN

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI SIMBION DARI
SPONS LAUT YANG BERPOTENSI SEBAGAI
ANTIMIKROBA**



Tim Pengusul:

Ketua : apt. Ani Pahriyani, M.Sc. (NIDN : 0302048504)
Anggota : apt. Elly Wardani, M.Farm. (NIDN : 0322098405)

**PROGRAM STUDI APOTEKER
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS,
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA
TAHUN 2020**

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Dari Spons Laut Yang Berpotensi Sebagai Antimikroba
 2. Ketua Peneliti : Ani Pahriyani, M.Sc., Apt.
 - a NIDN : 0302048504
 - b Bidang keahlian : Farmakologi
 - c Email : myname.4nie@gmail.com
 - d Fakultas : Farmasi dan Sains
 3. Anggota Peneliti : Elly Wardani, M.Farm., Apt.
 - a NIDN : 0302048504
 - b Bidang keahlian : Farmakologi
 - c Email : myname.4nie@gmail.com
 - d Fakultas : Farmasi dan Sains
 4. Waktu Penelitian : 6 Bulan
-

Mengetahui,

Jakarta, 18 Juni 2020

Ketua Program Studi**Ani Pahriyani, M.Sc., Apt.
NIDN. 0302048504****Ketua Peneliti,****Ani Pahriyani, M.Sc., Apt.
NIDN. 0302048504**Menyetujui,
Dekan FFS UHAMKA**Dr. Hadi Sunaryo, M.Si., Apt.
NIDN. 0325067201**

ABSTRAK

Bakteri simbion telah diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder yang saat ini semakin banyak dimanfaatkan untuk memperoleh senyawa bioaktif. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Mulyaningsih (2016) telah diketahui bahwa bakteri simbion dari spons laut *Sphaciospongia inconstans* asal Pulau Harapan, Kepulauan Seribu berpotensi untuk menghasilkan senyawa antibakteri. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi spesies dari isolat bakteri simbion spons *Sphaciospongia inconstans* penghasil antibakteri berdasarkan gen 16S rRNA. Dari penelitian sebelumnya didapatkan lima isolat bakteri simbion dan DNA kelima isolat bakteri diisolasi dengan menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, kemudian dilakukan amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 27f dan 1492r. Hasil amplifikasi kemudian disekuensing dan dilakukan penyejajaran menggunakan program BLAST. Hasil dari penelitian ini hanya berhasil mengidentifikasi isolat bakteri simbion 6FS3 yang memiliki kemiripan dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 dengan tingkat homologi sebesar 100%.

Kata kunci : Bakteri simbion, Spons laut *Sphaciospongia inconstans*, antibakteri, PCR gen 16S rRN

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
A. Alat dan Bahan.....	11
B. Prosedur Penelitian.....	12
C. Analisa Data.....	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	40

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Genom Isolat Bakteri Simbion <i>Sphaciospongia inconstans</i>	29
Gambar 2. Hasil Elektroforesis Amplikon Isolat Bakteri Simbion <i>Sphaciospongia inconstans</i>	30
Gambar 3. Hasil <i>nucleotide</i> BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Simbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i> kode 6FS3	33
Gambar 4. Deskripsi Hasil <i>nucleotide</i> BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Simbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i> kode 6FS3	34
Gambar 5. Pohon Filogenik Isolat Bakteri Simbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i> kode 6FS3	35

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1.	Determinasi Hewan	43
Lampiran 2.	Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i>	44
Lampiran 3.	Komposisi Medium dan Pembuatan Medium	45
Lampiran 4.	Skema Kerja Secara Keseluruhan	46
Lampiran 5.	Skema Kerja Peremajaan Isolat Bakteri	47
Lampiran 6.	Skema Kerja Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Symbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i>	48
Lampiran 7.	Skema Kerja Isolasi DNA Genom	49
Lampiran 8.	Skema Kerja Analisis DNA Genom dengan Elektroforesis	51
Lampiran 9.	Skema Kerja Proses Amplifikasi DNA dengan PCR	52
Lampiran 10.	Hasil Peremajaan Isolat Bakteri Symbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i>	53
Lampiran 11.	Hasil Karakterisasi Morfologi Secara Mikroskopik	54
Lampiran 12.	Cara Perhitungan Bahan-Bahan untuk Identifikasi Molekuler	55
Lampiran 13.	Hasil Isolasi DNA Genom dan Hasil Amplifikasi DNA dengan PCR	57
Lampiran 14.	Elektroferogram Hasil Sekuensing Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Symbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i> Kode 6FS3	58
Lampiran 15.	Hasil <i>Cosensus</i> Primer 27f dan 1492r dari Isolat Bakteri Symbion Spons Laut <i>Sphaciospongia inconstans</i> Kode 6FS3	59
Lampiran 16.	Bahan-Bahan Penelitian	60
Lampiran 17.	Alat-Alat Penelitian	63

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi adalah invasi jaringan tubuh hospes oleh organisme penyebab penyakit, diikuti perbanyakan diri, dan reaksi jaringan (Soedarto 2015). Permasalahan penyakit infeksi yang semakin kompleks memungkinkan tingkat patogenitas juga semakin meningkat, sehingga penanganan penyakit infeksi membutuhkan penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak terkendali menyebabkan timbulnya resistensi bakteri (Brooks dkk. 2005). Resistensi bakteri mendorong berbagai penelitian untuk mengeksplorasi penemuan senyawa bioaktif baru. Eksplorasi penemuan senyawa bioaktif baru telah banyak dilakukan terhadap berbagai sumber di alam, salah satunya adalah biota laut. Biota laut yang telah banyak dieksplorasi dan berpotensi besar sebagai sumber senyawa bioaktif adalah spons laut (Abubakar dkk. 2011).

Kemampuan spons menghasilkan senyawa bioaktif yang telah banyak dipublikasikan merupakan hasil simbiosis dengan bakteri yang hidup komensal bersamanya. Senyawa bioaktif hasil simbiosis merupakan kontribusi dari bakteri sebagai pertahanan spons dalam melawan predator dan bakteri patogen. Selain itu, bakteri yang bersimbiosis dengan spons berperan membantu spons menghasilkan senyawa antibiotik (Taylor *et al.* 2007). Hal tersebut mendasari dugaan bahwa bakteri simbiosis mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang serupa dengan spons dan menyebabkan keberadaan bakteri simbiosis terus dieksplorasi. Hasil eksplorasi bakteri simbiosis memiliki manfaat yang besar dalam pencarian potensi bakteri simbiosis spons laut (Abubakar dkk. 2011).

Potensi bakteri simbiosis spons laut dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder memiliki kemiripan struktur dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh spons. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis didapatkan dengan cara mengisolasi bakteri yang hidup dengan spons laut. Isolasi bakteri yang hidup dengan spons laut tersebut dapat menjadi sumber penghasil senyawa aktif yang lebih mudah didapatkan dibandingkan dengan menggunakan spons. Terbatasnya jumlah spons di alam karena pertumbuhannya yang lambat merupakan salah satu penyebab spons sudah jarang digunakan. Masalah keterbatasan ini dapat diatasi dengan menggunakan bakteri simbiosis spons karena dapat dimurnikan dan dikultivasi dalam skala laboratorium dengan waktu yang singkat. Kultivasi dengan suatu medium akan

menghasilkan suatu metabolit sekunder yang akan diuji aktivitasnya sebagai antibakteri (Taylor *et al.* 2007).

Bakteri simbiosis spons yang memiliki aktivitas antibakteri harus terus dieksplorasi. Indonesia yang mempunyai luas laut lebih besar dibanding daratan sangat berpotensi melakukan eksplorasi bakteri simbiosis spons laut sebagai sumber bahan obat baru. Perairan Pulau Harapan di Kepulauan Seribu Jakarta merupakan salah satu kawasan eksplorasi biota laut yang menyimpan kekayaan biota laut tinggi. Mujiyanto dan Syam (2012) melaporkan bahwa penyebaran spons di perairan Pulau Harapan cukup luas, sehingga eksplorasi terhadapnya masih sangat terbuka. Eksplorasi terhadap spons dan bakteri simbiosis menjadi perlu dilakukan untuk sumber bahan obat baru. Keberadaan spons laut di perairan Pulau Harapan memungkinkan ditemukannya bakteri simbiosis sebagai penghasil senyawa bioaktif antibiotik baru.

Kanagasabhapathy *et al.* (2005) melaporkan bahwa *Vibrio* sp. yang bersimbiosis dengan spons *Pseudoceratina purpurea* mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Kim *et al.* (2006) melaporkan bahwa bakteri laut memiliki potensi sebagai sumber bahan antibiotik rifampisin. Montalvo *et al.* (2005) melaporkan bahwa bakteri simbiosis spons berpotensi dalam memproduksi bahan bioaktif. Radjasa dkk. (2007) melaporkan bahwa bakteri simbiosis spons *Aaptos* sp. berpotensi sebagai antibakteri. Murniasih dan Rasyid (2010) melaporkan bahwa bakteri simbiosis spons asal Barrang Lompo Makassar berpotensi mengandung substansi aktif antibakteri. Abubakar dkk. (2011) melaporkan bahwa bakteri simbiosis spons *Jaspis* sp. asal Waigeo Papua berpotensi sebagai antimikroba.

Hentschel *et al.* (2001) melaporkan bakteri simbiosis spons *Aplysina aerophoba* dan *Aplysina cavernicola* asal Mediterranean memiliki aktivitas antibakteri. Nurhayati dkk. (2006) melaporkan isolat bakteri kode 6A3 dari spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu yang diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan kemiripan 96% dengan *Chromohalobacter* sp. Radjasa dkk. (2007) melaporkan isolat bakteri simbiosis spons *Aaptos* sp. dari Laut Jawa Utara kode SPA1 memiliki kemiripan sebesar 99% dengan *Halomonas aquamarina*, isolat kode SPA2 memiliki kemiripan sebesar 100% dengan *α -proteobacterium* D21, dan isolat kode SPA3 memiliki kemiripan sebesar 100% dengan *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. Abubakar dkk. (2011) melaporkan bakteri simbiosis spons *Jaspis* sp. asal Pulau Waigeo, Papua Barat yaitu genus *Pseudomonas* dan genus *Bacillus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Judianti dkk. (2014) melaporkan isolat bakteri dari spons *Demospongiae*

asal Pantai Paciran Lamongan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Marzuki dkk. (2015) melaporkan bakteri simbiosis *Callyspongia* sp. asal Pantai Melawai, Kalimantan Timur yang diidentifikasi berdasarkan gen 16S rRNA pada isolat ke 1 memiliki kemiripan 89% terhadap *Bacillus subtilis* dan isolat ke 2 memiliki kemiripan 99% terhadap *Bacillus flexus*.

Berdasarkan hal di atas, maka dilakukan penelitian potensi dan identifikasi molekuler bakteri simbiosis spons laut *Sphaciospongia inconstans* sebagai sumber bahan antibakteri asal perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta. Identifikasi secara molekuler dilakukan untuk mengetahui spesies dari isolat bakteri tersebut yang dapat dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan permasalahan : apakah bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut *Sphaciospongia inconstans* asal perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri dan dapat diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut *Sphaciospongia inconstans* asal perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif antibakteri.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberi pembuktian ilmiah mengenai potensi senyawa bioaktif dari isolat bakteri yang bersimbiosis dengan spons laut *Sphaciospongia inconstans* sebagai antibakteri dan dapat memberikan kontribusi besar terhadap penemuan senyawa antibakteri baru yang berasal dari Indonesia dalam bidang bioteknologi khususnya dalam rekayasa genetika.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* (Dendy 1887)

Klasifikasi:

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Phylum	: <i>Porifera</i>
Class	: <i>Demospongiae</i>
Ordo	: <i>Clionaida</i>
Genus	: <i>Sphaciospongia</i>
Species	: <i>Sphaciospongia inconstans</i>

Spons adalah hewan yang tergolong dalam filium *porifera* yang berbentuk seperti kantung yang sesil (Fried dan Hademenos 2006). Terdapat tiga kelas filium *porifera* yaitu *Demospongiae*, *Hexactinellida*, dan *Calcarea*. Dari 6.000 spesies hidup yang secara resmi telah dijelaskan, 85% merupakan kelas dari *Demospongia* (Hentschel *et al.* 2005). Spons adalah salah satu metazoa tertua yang merupakan hewan multiseluler yang paling sederhana (Hentschel *et al.* 2005; Hickman *et al.* 2010). Hewan ini hidup menetap pada karang atau permukaan benda yang keras lainnya di dasar air. Beberapa spons hidup di air tawar, tetapi sebagian besar hidup di dalam laut (Kimball 1999).

Spons memiliki ukuran diameter yang bervariasi, mulai dari ukuran milimeter sampai lebih dari 2 m. Banyak spesies spons berwarna cerah karena memiliki pigmen dalam sel kulit mereka, seperti spons yang berwarna merah, kuning, oranye, hijau, dan ungu (Hickman *et al.* 2010). Bentuk spons dipertahankan oleh kerangka yang terdiri dari spikula yang cukup keras, yang tersusun dari silika ataupun zat kapur (kalsium karbonat) yang dibentuk oleh sel-sel yang tersebar di dalam mesoglea. Beberapa spons tidak mempunyai spikula tetapi didukung oleh anyaman serabut yang kuat dan lentur (Kimball 1999). Tubuh spons terdiri dari dua lapis, yaitu epidermis di bagian luar dan lembaran sebelah dalam terutama tersusun atas koanosit, keduanya dipisahkan oleh sebuah kompartemen bergelatin yaitu mesoglea. Pada permukaan tubuh dari spons terdapat banyak pori-pori yang menembus tubuhnya (Fried dan Hademenos 2006).

Pori-pori yang dimiliki spons berguna untuk menghisap air, kemudian air tersebut bergerak melalui rongga interior (*spongosoel*) di dalam tubuh spons dan keluar melalui lubang pengeluaran arus (oskulum) (Fried dan Hademenos 2006). Proses menghisap air tersebut adalah

cara yang dilakukan oleh spons untuk mencari makanan. *Choanocytes* dalam tubuh spons berfungsi menyaring partikel makanan (termasuk bakteri dan mikroalga) dari air dan ditransfer ke mesohil. Di dalam mesohil, partikel makanan dicerna melalui fagositosis oleh *archaeocytes*. Organisme sesil seperti spons dan invertebrata laut lainnya sangat bergantung pada produksi bahan kimia sebagai bentuk pertahanan terhadap musuh alami seperti predator dan kompetitor (Taylor *et al.* 2007).

B. Bakteri Simbion Spons Laut

Spons laut dapat berinteraksi dengan mikroorganisme yang berada di sekitar lingkungan hidupnya. Mikroba yang berbeda dapat berguna sebagai sumber makanan, patogen/parasit atau simbiosis mutualistik untuk spons (Taylor *et al.* 2007). Spons memiliki kemampuan dalam penyaringan makanan sehingga mikroorganisme dapat masuk ke dalam tubuhnya sebagai sumber makanan, tetapi mikroorganisme yang dapat tahan terhadap proses pencernaan akan tetap di dalam spons menjadi mikroba simbiosis (Lee *et al.* 2001). Bakteri simbiosis dapat ditemukan di dalam sel-sel *amoebocyte* (*archaeocyte*) dan pada lapisan *mesohyl* secara ekstraseluler. Selain itu, bakteri simbiosis juga dapat ditemukan pada bagian permukaan luar tubuh spons, atau biasa dikenal dengan sebutan bakteri epibiotik/epibion (Ismet dkk. 2011).

Interaksi yang terjadi antara mikroorganisme dan inangnya saling memberikan manfaat bagi keduanya. Mikroorganisme dapat memperoleh nutrisi dari inangnya, sedangkan inang tersebut mendapatkan manfaat dari berbagai bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang terkait. Beberapa eukariota laut sangat bergantung pada metabolit yang dihasilkan oleh mikroba simbiosis mereka untuk bertahan hidup. Sebagai contoh, *Gamma-proteobacterium* dari *Pseudoalteromonas tunicata*, yang dikenal untuk produksi beberapa senyawa bioaktif yang berperan dalam melindungi tuan rumah untuk melawan kolonisasi permukaan dengan memproduksi antimikroba, antilarval, dan antiprotozoa. Selain itu, spons mengandalkan simbiosis *Cyanobacteria autotrophic* mereka untuk menyediakan lebih dari 50% persyaratan energi mereka, yang memungkinkan mereka untuk tumbuh dalam lingkungan rendah gizi. Beberapa spons laut menggunakan karbon yang dihasilkan dari fotosintesis *Cyanobacteria* yang terkait (Paneyan *et al.* 2010).

Metabolit yang dihasilkan oleh simbiosis memiliki kemiripan dengan senyawa metabolit yang dimiliki inangnya (Proksch *et al.* 2002). Penggunaan senyawa bioaktif dari bakteri simbiosis

lebih menguntungkan dibanding dengan memanfaatkan senyawa bioaktif dari spons. Hal itu karena senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh eukariota laut jika diproduksi dengan skala besar terdapat banyak kesulitan. Kesulitan yang harus dihadapi antara lain, banyaknya organisme eukariotik mati dalam proses memperoleh bioaktif dan banyak dari eukariota tersebut tidak bisa dibudidayakan di laboratorium. Sebaliknya, banyak senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut dapat dengan mudah dibudidayakan dan dimanipulasi di bioreaktor. Oleh karena itu, pemanfaatan mikroba simbiosis bisa menjadi sumber terbaik dalam pencarian senyawa bioaktif baru (Panasyan *et al.* 2010).

C. Isolasi DNA

Sebagai unit keturunan terkecil, DNA terdapat pada semua makhluk mulai dari mikroorganisme sampai organisme. DNA adalah makromolekul yang tersusun atas unit berulang yang disebut nukleotida. Setiap nukleotida terdiri atas basa nitrogen adenin (A), timin (T), sitosin (C), dan guanin (G); deoksiribosa dan gugus fosfat. DNA di dalam sel terdapat sebagai rantai panjang nukleotida yang berpasangan dan membelit menjadi satu membentuk struktur heliks ganda. Pasangan basa selalu terdapat dalam pola spesifik yaitu adenin selalu berpasangan dengan timin dan sitosin selalu berpasangan dengan guanin (Pratiwi 2008). DNA ada yang terdapat di nukleus disebut dengan DNA kromosomal, sedangkan DNA lain yang terdapat di dalam sel yaitu DNA mitokondria, DNA kloroplas, dan DNA plasmid, ketiganya disebut ekstrakromosomal (Fatchiyah dkk. 2011).

Isolasi DNA merupakan tahap pertama dari berbagai teknologi analisa DNA. Untuk mengekstraksi DNA diperlukan langkah-langkah untuk memecah dinding sel dan membran inti, yang dilanjutkan dengan pemisahan DNA dari berbagai komponen sel lain. Pada saat melakukan pemisahan DNA, DNA harus dijaga agar tidak rusak dan didapatkan DNA dalam bentuk rantai yang panjang (Fatchiyah dkk. 2011). Prinsip dasar isolasi DNA adalah lisis sel (melisiskan DNA dari nukleus), penghilangan protein dan RNA, pengendapan DNA, pencucian DNA dari protein dan RNA, dan pemanenan DNA. Tujuan dilakukannya isolasi DNA adalah diperolehnya DNA total (genom) dengan konsentrasi tinggi dan bersih dari kontaminan (Rahayu dan Nugroho 2015).

DNA dari bakteri tersebut dapat digunakan dalam identifikasi molekuler untuk mengetahui spesies dari bakteri tersebut. Pada dasarnya isolasi DNA genom total dari sel bakteri

terdiri dari beberapa tahap, yaitu (1) kultivasi sel dalam media yang sesuai, (2) pemecahan dinding sel, (3) ekstraksi DNA genom, dan (4) purifikasi DNA. Pemecahan dinding sel bakteri dilakukan secara fisik misalnya dengan cara sonikasi, maupun cara kimia yaitu menggunakan enzim lisozim, EDTA, atau kombinasi dari keduanya. Pada kondisi tertentu, pemecahan dinding sel sering ditambahkan bahan lain yang dapat melisiskan dinding sel antara lain deterjen triton X-100 atau sodium deodenil sulfat (SDS). Setelah sel lisis, tahap selanjutnya adalah memisahkan debris sel dengan cara sentrifugasi. Tahap akhir adalah proses pemurnian yang umumnya dengan penambahan larutan fenol atau campuran fenol dan kloroform dengan perbandingan 1:1, untuk mengendapkan protein dilakukan dengan cara disentrifugasi dan dihancurkan secara enzimatik dengan proteinase (Radji 2011).

D. Gen Penyandi 16S rRNA

Ribosom terdiri atas dua subunit, yaitu subunit kecil dan subunit besar yang disusun oleh molekul-molekul rRNA dan beberapa macam protein. Molekul rRNA adalah RNA yang digunakan untuk menyusun ribosom, yaitu suatu partikel di dalam sel yang digunakan sebagai tempat sintesis protein. Gen yang mengkode rRNA bersifat spesifik untuk suatu spesies tertentu (*species-specific*), artinya sekuens promotor gen RNA sangat bervariasi di antara spesies (Yuwono 2005). Gen pengkode RNA ribosomal (rRNA) adalah gen yang paling lestari (*conserved*) sehingga gen ini dapat digunakan sebagai primer universal yang digunakan dalam PCR serta dapat ditentukan urutan nukleotidanya melalui sekuensing. Porsi sekuens rRNA dari tiap organisme yang secara genetik berkorelasi umumnya adalah sama. Dengan demikian, setiap organisme yang memiliki jarak kekerabatan tertentu dapat disejajarkan sehingga lebih mudah untuk menentukan perbedaan dalam sekuens yang menjadi ciri khas organisme tersebut (Rinanda 2011).

Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, gen 16S rRNA yang paling sering digunakan sebagai gen target. Hal tersebut karena molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisa statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisa. Gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisa suatu ekosistem. Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi

yang identik pada seluruh organisme. Molekul gen 16S rRNA juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik (Pangastuti 2006).

Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah dengan urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti 2006). Pendekatan molekuler untuk mendeteksi dan mengklasifikasikan bakteri bergantung pada amplifikasi PCR dan urutan analisa gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA adalah parameter yang cocok untuk klasifikasi bakteri, karena gen 16S rRNA bersifat universal di antara bakteri dan dilestarikan, tetapi memiliki variasi yang cukup untuk membedakan antar taksa (Ntushelo 2013). Data urutan basa gen penyandi 16S rRNA dapat digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme (Pangastuti 2006).

E. Primer

Primer merupakan suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA cetakan. Primer berfungsi untuk menginisiasi proses polimerisasi DNA secara *in vitro*, mengenali, dan menandai fragmen sampel DNA yang akan diamplifikasi (Rahayu dan Nugroho 2015). Sepasang primer oligonukleotida yang spesifik digunakan untuk membuat hibrid dengan ujung-5' menuju ujung-3' untai DNA target (Fatchiyah dkk. 2011). Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse* (Muladno 2010). Pasangan primer akan menempel pada DNA templat dan mengamplifikasi untai DNA, sehingga akan terbentuk fragmen-fragmen DNA (Aris dkk. 2013). Pemilihan primer merupakan poin terpenting dalam menentukan keberhasilan dalam proses amplifikasi dengan PCR (Rahayu dan Nugroho 2015).

Pemilihan primer yang kurang tepat dapat mengakibatkan terjadinya kesalahan segmen yang diamplifikasi, primer akan menempel pada bagian lain dari DNA yang tidak dikehendaki (Rahayu dan Nugroho 2015). Dalam merancang primer perlu diperhatikan panjang primer yang akan dipilih, umumnya 15-32 pasang basa. Beberapa hal penting yang harus diperhatikan pada

perancangan primer oligonukleotida antara lain yaitu, (1) Hindari merancang suatu primer pada daerah repetitif. (2) Kandungan GC primer harus 45-60%, ujung 3' harus terdiri dari basa G dan C. (3) Harus dihindari susunan tiga basa berturut-turut terdiri dari G atau C pada ujung primer, misalnya CCG, CCC, GCG, GGG, atau GCC. (4) Urutan basa sepasang primer tidak boleh saling komplementer karena dapat membentuk primer dimer (Radji 2011).

F. Identifikasi Molekuler

Data yang didapat dari hasil sekuensing berupa *peak* elektroferogram yang memperlihatkan sekuens basa nukleotida dari hasil amplifikasi gen yang telah dilakukan. Hasil visualisasi dari *peak* elektroferogram dapat dilihat dalam 4 warna yang menunjukkan perbedaan basa nukleotida. A (adenine) ditunjukkan dengan warna hijau, C (sitosin) ditunjukkan dengan warna biru, G (guanine) ditunjukkan dengan warna hitam, dan T (timin) ditunjukkan dengan warna merah (Rahayu dan Nugroho 2015). Analisa hasil sekuensing dapat dilakukan dengan menggunakan program *BioEdit* dengan mengedit basa nitrogen yang muncul pada elektroferogram. Sekuens DNA yang diperoleh akan dilakukan penyejajaran dengan sekuens DNA yang terdapat pada *database*. Informasi dari urutan gen 16S rRNA disimpan pada *database* sehingga memungkinkan peneliti bakteri untuk melakukan studi banding dalam mengklasifikasikan bakteri (Ntushelo 2013).

Beberapa *database* yang dapat digunakan untuk membandingkan sekuens 16S rRNA antara lain *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *Ribosomal Database Project* (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), *Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), dan *Smart Gene IDNS* (<http://www.smartgene.ch>) (Rinanda 2011). BLAST dari NCBI adalah program bioinformatika yang paling banyak digunakan untuk analisa sekuensing DNA (Ntushelo 2013). Sistem BLAST melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dapat digunakan untuk mencari nama spesies, persentase homologi DNA hasil sekuensing dengan membandingkan urutan DNA yang terdapat pada *database*. Pengajuan (submit) ke *GenBank* dilakukan guna mendapatkan nomor akses dan memperoleh kode strain sesuai yang diinginkan oleh peneliti, yang merupakan susunan basa yang dimiliki oleh masing-masing strain. Isolat bakteri yang memiliki persamaan sekuens 16S rRNA lebih besar dari 97% dapat mewakili spesies yang sama. Sedangkan persamaan sekuens antara 93%-97%

dapat mewakili identitas pada tingkat genus, tetapi berbeda pada tingkat spesies (Felix dkk. 2011).

Hubungan kekerabatan dari suatu organisme dapat diketahui dengan menggunakan topologi filogenetik. Topologi filogenetik merupakan jenis grafik yang digunakan untuk mengklasifikasikan organisme dan memvisualisasikan hubungan evolusi di antara spesies. Salah satu tujuan penyusunan filogenetik adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan memperkirakan perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada turunannya (Rahayu dan Nugroho 2015). Pohon filogenetik membuat percabangan yang menghubungkan titik (*nodes*) yang merupakan unit taksonomi, seperti spesies atau gen sedangkan akar pohonnya merupakan titik yang bertindak sebagai nenek moyang untuk seluruh organisme yang sedang dianalisa. Penyejajaran (*alignment*) sekuens sampel dengan sekuens dari *database GenBank* dapat dilakukan menggunakan program *Clustal X*. Setelah dilakukan penyejajaran, hasil dalam bentuk pohon filogenetik dapat dilihat pada program *Treeview* (Felix dkk. 2011).

BAB 3. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang dipakai antara lain: Erlenmeyer, mikroskop, gelas ukur, Beaker *glass*, LAF, cawan Petri, pipet mikro, autoklaf, oven, *hote plate*, *waterbath*, timbangan analitik, *microcentrifuge refrigerator*, *UV transiluminator*, *PCR thermo cycler*, elektroforesis, dan vortex. Bahan uji yang digunakan yaitu Spons laut *Sphaciospongia inconstans*, diperoleh dari perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta pada kedalaman 2-10 m dengan teknik *scuba diving*. Setelah diangkat dari permukaan laut, segera dilakukan dokumentasi dan diambil sebagian jaringan sponsnya. Jaringan spons yang telah didokumentasi dibawa ke Laboratorium menggunakan *cool box*. Bakteri uji yang digunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Kemudian dilakukan determinasi di Pusat Penelitian Oseanografi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Ancol Jakarta.

B. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel Spons

Sampel spons yang bersimbiosis dengan bakteri diambil di perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta pada kedalaman 2-10 m dengan teknik *scuba diving* pada bulan April 2016. Setelah diangkat dari permukaan laut, segera dilakukan dokumentasi dan diambil sebagian jaringan sponsnya. Jaringan spons yang telah didokumentasi dibawa ke Laboratorium menggunakan *cool box*.

2. Determinasi

Spons laut yang diperoleh dari perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Jakarta dilakukan determinasi di Pusat Penelitian Oseanografi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Ancol Jakarta.

3. Persiapan Awal

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah digunakan untuk mensterilkan medium, akuades, dan alat-alat plastik

dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan untuk alat-alat yang terbuat dari kaca disterilisasi menggunakan sterilisasi panas kering dalam oven pada suhu 160-170°C selama 2-3 jam (Pratiwi 2008).

b. Pembuatan Medium

1. Nutrient Agar (NA)

Medium NA ditimbang lebih kurang 28 g kemudian dilarutkan dalam 1 l akuades dan dipanaskan sampai bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium NA digunakan sebagai media uji potensi antibakteri ekstrak metabolit sekunder bakteri simbiosis.

2. Nutrient Broth (NB)

Medium NB ditimbang lebih kurang 13 g kemudian dilarutkan dalam 1 l akuades dan dipanaskan sampai bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium NB digunakan sebagai suspensi mikroba uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

3. Marine Agar (MA)

Komposisi medium *Marine Agar* terdiri dari 15,0 g agar, 0,1 g FePO₄, 5,0 g pepton, 1,0 g ekstrak khamir, dan 750 ml *artificial seawater* (Atlas 2010). Campuran medium dipanaskan sampai bahan larut dalam 1 l akuades, kemudian medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Pembuatan medium *Marine Agar* digunakan untuk mengisolasi bakteri simbiosis spons.

4. Marine Broth (MB)

Komposisi *Marine Broth* terdiri dari 0,1 g FePO₄, 5,0 g pepton, 1,0 g ekstrak khamir, dan 750 ml *artificial seawater* (Atlas 2010). Campuran medium dipanaskan sampai bahan larut dalam 1 l akuades, kemudian medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Pembuatan medium *Marine Broth* digunakan untuk mengisolasi bakteri simbiosis spons.

5. Peptone Yeast Glucose Seawater Broth (PYGSB)

Komposisi PYGSB terdiri dari 3,0 g glukosa, 1,25 g pepton, 1,25 g ekstrak khamir, dan 25 ml *seawater* (Atlas 2010). Campuran medium dipanaskan sampai bahan larut dalam 1 l akuades, kemudian medium PYGSB disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dalam autoklaf. Pembuatan medium PYGSB digunakan untuk mengkulturisasi isolat bakteri simbiosis spons.

c. Artificial Seawater (ASW)

Komposisi *artificial seawater* terdiri dari 27,5 g NaCl, 6,78 g MgSO₄, 5,38 g MgCl₂, 0,72 g KCl, 0,2 g NaHCO₃, 1,4 g CaCl₂ (Atlas 2010). Campuran semua bahan dilarutkan dalam 1 l

akuades, kemudian *artificial seawater* disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dalam autoklaf. *Artificial seawater* digunakan pada pengenceran berseri sampel spons.

4. Isolasi Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

Metode yang digunakan untuk mengisolasi bakteri symbion spons adalah metode penanaman langsung dan metode pengkayaan. Metode penanaman langsung dilakukan dengan cara menghaluskan sampel spons dengan blender, ditimbang lebih kurang 1 g sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml *artificial seawater*, kemudian dihomogenkan dengan vortex. Setelah itu, dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} terhadap suspensi sampel spons dalam *artificial seawater*. Suspensi tiga hasil pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} masing-masing diambil 100 μ l dan disebar pada medium *Marine Agar* menggunakan *spread plate methode*. Medium yang telah mengandung suspensi sampel spons diinkubasi pada suhu 37°C selama dua minggu.

Metode pengkayaan dilakukan dengan cara menghaluskan sampel spons menggunakan blender. Sampel spons yang telah halus ditimbang lebih kurang 1 g dan dimasukkan ke dalam 9 ml medium *Marine Broth*, kemudian dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi selama 2 minggu. Setelah dua minggu, kemudian dilakukan pengenceran berseri 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} . Suspensi tiga hasil pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} masing-masing diambil 100 μ l dan disebar pada medium *Marine Agar* menggunakan *spread plate methode*. Medium yang telah mengandung suspensi sampel spons diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama dua minggu.

5. Karakterisasi Isolat Bakteri Symbion Spons

a. Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* Secara Makroskopis

Pengamatan koloni dilakukan pada isolat yang telah diisolasi dengan metode penanaman langsung dan pengkayaan. Ariyanto dkk. (2013) melaporkan bahwa pengamatan koloni secara makroskopis meliputi warna koloni, bentuk koloni, permukaan koloni, dan pertumbuhan koloni. Pengamatan morfologi dilakukan kembali setelah diinkubasi selama 1-2 hari dan pengamatan ini terus dilakukan sampai didapatkan isolat murni. Selanjutnya masing-masing isolat murni dipindahkan ke dalam medium *Marine Agar slant* sebagai kultur biakan stok dan biakan kerja (Kumala dan Fitri 2008).

b. Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* Secara Mikroskopis

Pengamatan morfologi isolat bakteri simbion secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram pada dinding sel bakteri untuk melihat bentuk sel bakteri dan membedakan jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pengamatan ini diawali dengan mensterilkan kaca objek dengan alkohol 70%, kemudian memindahkan hasil isolat bakteri simbion spons pada kaca objek sebanyak satu ose dan ditetesi menggunakan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak satu tetes untuk difiksasi di atas nyala api sampai mengering. Pewarna karbol kristal ungu (Gram A) ditetesi di atas preparat dan didiamkan selama 5 menit lalu dibilas menggunakan akuades dan dibiarkan sampai mengering. Pewarna kedua yang diberikan adalah larutan lugol (Gram B) yang ditetesi di atas preparat dan didiamkan selama 45-60 detik lalu dibilas dan dibiarkan sampai mengering. Alkohol 96% (Gram C) ditetesi di atas preparat dan didiamkan selama 15-30 detik lalu dibilas dan dibiarkan sampai mengering. Pewarna yang terakhir pada pewarnaan adalah safranin (Gram D) ditetesi di atas preparat dan dibiarkan selama 1-2 menit lalu dibilas dan dibiarkan sampai mengering, kemudian diamati di bawah mikroskop (Radji 2010).

6. Skrining Potensi Antibakteri dari Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

Isolat murni yang telah diperoleh dari hasil isolasi dilakukan pengujian potensi antibakteri dengan cara kultivasi. Kultivasi dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose masing-masing isolat ke dalam 10 ml medium PYGSB. Kultivasi dilakukan selama 5 hari menggunakan *portable shaker* dengan kecepatan agitasi 125 rpm. Setelah waktu kultivasi produksi metabolit sekunder dari bakteri simbion spons laut sudah tercapai, selanjutnya dilakukan pemanenan. Proses pemanenan dilakukan dengan sentrifugasi pada kecepatan agitasi 4000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan bagian supernatan dan bagian pelet.

Pelet yang terbentuk dikeringkan dan ditimbang, sedangkan bagian supernatan dilakukan uji potensi antibakteri. Pengujian potensi antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar dengan memasukkan cakram pada supernatan dan diletakkan pada medium yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian diukur diameter zona hambat yang terbentuk. Zona hambat pada masing-masing isolat bakteri simbion dilakukan perbandingan. Isolat yang

memiliki zona hambat terbesar dipilih sebagai isolat yang paling potensial dalam menghasilkan metabolit sekunder antibakteri.

7. Produksi Metabolit Sekunder Isolat Potensial Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

Isolat potensial yang telah terpilih dikultivasi dengan 300 ml medium PYGSB yang dilakukan secara triplo. Inkubasi dilakukan selama 5 hari pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 125 rpm. Setelah waktu kultivasi sudah tercapai, selanjutnya dilakukan pemanenan dengan sentrifugasi pada kecepatan agitasi 4000 rpm selama 15 menit hingga didapatkan bagian supernatan dan bagian pelet. Bagian pelet yang terbentuk dikeringkan dan ditimbang, sedangkan bagian supernatan dilakukan ekstraksi cair:cair dengan pelarut etanol 96% (1:3 v/v). Ekstrak etanol bakteri symbion dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40-50°C, selanjutnya ekstrak kering digunakan untuk uji potensi antibakteri.

8. Uji Potensi Antibakteri Ekstrak Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Symbion Spons

a. Penapisan Senyawa Aktif Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Symbion Spons

1) Uji Steroid

Uji steroid dilakukan dengan cara mengukur ekstrak pekat sebanyak 2 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung dan direaksikan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Perubahan warna menjadi hijau biru menunjukkan hasil positif terhadap steroid (Depkes RI 2000).

2) Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara ditimbang seksama 50 mg ekstrak kering, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan metanol. Setelah itu dipanaskan di atas tangas air, didinginkan, dan disaring. Hasil saringan kemudian ditambahkan HCl pekat dan logam Mg. Terbentuknya warna kuning, jingga, atau merah menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI 2000).

3) Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara ditimbang seksama 50 mg ekstrak kering, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 tetes HCl, dan 18 tetes air. Selanjutnya dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Hasil saringan dipindahkan ke dalam 2 tabung reaksi yang berbeda, tabung pertama diberi 3 tetes pereaksi

Dragendorff dan akan menghasilkan endapan jingga, sedangkan tabung kedua diberi 3 tetes pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih (Depkes RI 2000).

4) Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara ditimbang seksama 50 mg ekstrak kering, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml air panas. Setelah itu didinginkan dan dikocok selama 10 detik, sehingga terbentuk buih tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm-10 cm. Selanjutnya apabila pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang, maka larutan tersebut positif mengandung saponin (Depkes RI 2000).

b. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Symbion Spons

Ekstrak kering supernatan yang telah diperoleh dibuat konsentrasi larutan uji dengan orientasi 1-16 mg/ml. Larutan uji dibuat variasi konsentrasi dengan menimbang 1 g ekstrak dan dilarutkan dalam 10 ml akuades, sehingga akan diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 mg/ml. Setelah itu, dilakukan pengenceran hingga didapat konsentrasi 1, 2, 4, 8, dan 16 mg/ml. Pengenceran dilakukan dengan cara diambil masing-masing konsentrasi sebanyak 0,1; 0,2; 0,4; 0,8, dan 1,6 ml, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian akuades ditambahkan sampai tanda batas (Nofiani dkk. 2009).

c. Pembuatan Antibiotik Pembanding Kloramfenikol

Zat pembanding kloramfenikol ditimbang lebih kurang 10 mg dan dilarutkan dalam akuades, kemudian dicukupkan volumenya dengan akuades steril hingga 100 ml, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 µg/ml. Hasil dari larutan induk kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh masing-masing konsentrasi 5, 10, 15, dan 20 µg/ml.

d. Uji Potensi Antibakteri dengan Metode Difusi

Uji potensi antibakteri dilakukan dengan metode difusi. Larutan NA yang telah diinokulasikan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebanyak 10% dengan transmittan 25% dituangkan ke dalam cawan Petri sebanyak lebih kurang 100 ml. Setelah itu kertas cakram diletakkan pada medium padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah waktu inkubasi tercapai dilakukan pengamatan terhadap zona hambat yang terbentuk (Benson 2002).

9. Isolasi DNA Genom

Proses isolasi dilakukan berdasarkan pada protokol *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) untuk bakteri Gram positif. Isolat bakteri yang akan digunakan untuk proses isolasi DNA terlebih dahulu dikultur dalam medium *Marine Broth*. Kultur bakteri kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah proses inkubasi, kultur bakteri sebanyak 1 ml dipindahkan ke dalam *microcentrifuge tube*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit hingga didapat bagian supernatan dan bagian pelet. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi dibuang sehingga hanya tersisa pelet sel bakteri. Pelet sel bakteri diresuspensi dalam 480 µl EDTA. Dinding sel bakteri dilemahkan dengan menggunakan enzim lizozim sebanyak 120 µl yang ditambahkan pada pelet sel yang telah disuspensikan, lalu dihomogenkan. Tahap selanjutnya adalah inkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm dan supernatan yang terbentuk dihilangkan.

Pelet yang didapat kemudian ditambahkan *nuclei lysis solution* sebanyak 600 µl dan dihomogenkan. Proses selanjutnya adalah diinkubasi dengan suhu 80 °C selama 5 menit untuk melisis sel bakteri, kemudian didinginkan pada suhu kamar. Tahap berikutnya *RNase solution* ditambahkan sebanyak 3 µl dan dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu kamar. *Protein precipitation solution* kemudian ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 200 µl, lalu divortex selama 20 detik hingga homogen. Setelah homogen kemudian sampel diinkubasi dalam es selama 5 menit. Proses selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung sentrifugasi lain kemudian ditambahkan 600 µl isopropanol pada suhu kamar, setelah itu dihomogenkan dengan cara inversi hingga terbentuk benang-benang DNA. Sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit, kemudian supernatan dituang dengan hati-hati dan tabung dikeringkan di atas kertas penyerap. Tahap selanjutnya ditambahkan etanol 70% sebanyak 600 µl, lalu inversi tabung secara perlahan untuk mencuci pelet DNA. Sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipisahkan dari pelet DNA di atas kertas penyerap dan pelet DNA dikeringkan selama 10-15 menit. Setelah pelet DNA dikeringkan kemudian ditambahkan *DNA rehydration solution* sebanyak 100 µl ke dalam tabung yang berisi pelet DNA dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam. Hasil DNA murni yang didapat disimpan segera pada suhu 2-8 °C.

10. Analisis DNA Genom dengan Elektroforesis

Analisis DNA genom dengan elektroforesis dilakukan menggunakan agarosa dengan konsentrasi 1%. Agarosa dengan konsentrasi 1% dapat dibuat dengan cara menimbang agarosa sebanyak 0,5 g dan dicampur dengan 50 ml larutan *buffer* TAE 1x. Larutan agarosa dipanaskan sampai didapatkan larutan yang jernih. Larutan yang masih cair (dengan temperatur sekitar 60 °C) dituang ke dalam pencetak gel, kemudian sisir ditempatkan di dekat tepian gel dan gel dibiarkan mengeras. Setelah gel mengeras sisir diangkat, kemudian cetakan gel agarosa dipindahkan ke wadah elektroforesis yang sebelumnya telah diberi *buffer* TAE 1x sampai menggenangi permukaan gel agarosa.

Tahap selanjutnya DNA hasil isolasi sebanyak 10 µl ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 2 µl lalu dihomogenkan. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam lubang gel agarosa, pada lubang yang lainnya dimasukkan campuran dari 2 µl DNA *ladder* 1 kb, *loading dye* 6x sebanyak 2 µl, dan 8 µl ddH₂O. Alat elektroforesis kemudian dinyalakan dan diatur dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Setelah proses tersebut selesai gel agarosa diambil dan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi etidium bromida selama 15 menit dalam ruang gelap, lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya hasil diamati dengan menggunakan UV *transiluminator*, jika terlihat pita DNA menunjukkan hasil yang positif. Hasil yang didapat kemudian difoto untuk dokumentasi.

11. Amplifikasi DNA Genom dengan PCR

Proses amplifikasi DNA genom bakteri terhadap gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan *forward* primer 27f (5'- AGA GTT TGA TCA CTG GCT CAG -3') dan *reverse* primer 1492r (5'- TAC GGC TTA CCT TGT TAC GA -3') seperti yang digunakan oleh Elavazhagan *et al.* (2009). Proses amplifikasi dilakukan berdasarkan protokol dari *Go Taq Green Master Mix* 2x. Pada mikrotube 0,2 ml dimasukkan *Go Taq Green Master Mix* 2x sebanyak 12,5 µl kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 3,5 µl campuran dihomogenkan sampai larut. Primer 27f dan primer 1492r masing-masing diambil sebanyak 2,5 µl dan ditambahkan ke dalam campuran larutan tersebut lalu dihomogenkan. Template DNA sebanyak 4 µl ditambahkan ke dalam masing-masing *microtube* untuk memperoleh volume total 25 µl, lalu dihomogenkan. Larutan *dispin* dan dimasukkan ke dalam alat PCR.

Tahapan proses PCR menurut Fitriani (2016) terdiri dari:

1. *Initial denaturation* dilakukan sebanyak 1 siklus pada suhu 95 °C selama 5 menit.

2. Denaturasi dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 95 °C selama 1 menit.
3. *Annealing* dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 55 °C selama 1 menit.
4. Ekstensi dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 72 °C selama 1 menit.
5. Ekstensi akhir dilakukan sebanyak 1 siklus pada suhu 72 °C selama 10 menit.

12. Analisis Amplikon dengan Elektroforesis

Analisis amplikon dilakukan dengan menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1% yang dibuat dengan cara menimbang agarosa sebanyak 0,5 g dan dicampur dengan 50 ml larutan *buffer* TAE 1x. Larutan agarosa dipanaskan sampai mendidih dan larut, setelah itu larutan agarosa didinginkan. Setelah sudah cukup dingin kemudian dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir dan didiamkan sampai membeku. Setelah membeku sisir diangkat, kemudian cetakan gel agarosa dipindahkan ke wadah elektroforesis yang sebelumnya telah diberi *buffer* TAE 1x sampai menggenangi permukaan gel agarosa. Campuran dari 2 µl DNA *ladder* 1 kb, *loading dye* 6x sebanyak 2 µl, dan 8 µl ddH₂O dihomogenkan kemudian dimasukkan ke dalam lubang pada gel agarosa sebanyak 5 µl. Pada lubang gel agarosa yang lainnya dimasukkan amplikon sebanyak 5 µl.

Tahap selanjutnya alat elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 50 volt selama 45 menit. Setelah proses tersebut selesai gel agarosa diambil dan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi etidium bromida selama 15 menit dalam ruang gelap, lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya hasil diamati dengan menggunakan UV *transiluminator*, fragmen DNA yang muncul menunjukkan hasil yang positif. Hasil yang didapat kemudian difoto untuk dokumentasi.

13. Sekuensing Gen 16S rRNA

Amplikon yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikrotube 0,5 ml yang kering dan steril, kemudian dilabeli dan disegel dengan menggunakan parafilm untuk mencegah kebocoran dan perembesan. Sampel dikirim ke 1st BASE *Laboratories* di Malaysia untuk dilakukan purifikasi dan sekuensing (Fadhilah 2016).

14. Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing gen 16S rRNA dilakukan dengan program *BioEdit*. Hasil yang didapat kemudian dibandingkan dengan data yang terdapat pada *GenBank* dengan menggunakan program BLAST (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tahap selanjutnya dilakukan karakterisasi dengan melakukan penyejajaran terhadap sekuens *query* dengan sepuluh sekuens

gen 16S rRNA bakteri lain pada *database* yang dianggap mirip dengan menggunakan program *ClustalX2* dan dibuat pohon filogenetik dengan menggunakan program *Treeview* untuk mengetahui hubungan kekerabatan (Fadhilah 2016).

C. Analisis Data

Pada penelitian ini desain yang digunakan bersifat eksploratif yaitu dengan tujuan mengisolasi bakteri dari spons laut yang berpotensi memproduksi senyawa antibakteri. Analisis data yang diperoleh bersifat kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif diperoleh dengan mengamati morfologi koloni bakteri simbion secara makroskopik dan mikroskopik. Data kuantitatif diperoleh dengan mengamati dan menghitung daerah diameter zona hambat yang terbentuk pada mikroba uji. Data diameter zona hambat yang diperoleh dihitung secara statistik dengan regresi linear dengan rumus :

$$Y = a + bx \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan : Y = Diameter hambat

a = Intersep

b = Nilai *slope*

Kemudian dihitung juga kesetaraan konsentrasi larutan uji bakteri dengan antibiotik kloramfenikol sebagai pembanding terhadap zona hambat yang terbentuk, sehingga diperoleh nilai potensi relatifnya (Rusdi dkk. 2010).

$$PR = \frac{X_s}{X_u} \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan : PR = Potensi Relatif

X_s = Konsentrasi antibiotik pembanding

X_u = Konsentrasi larutan uji bakteri simbion

Analisis data hasil deteksi PCR dengan elektroforesis dianalisa dengan didasarkan pada ada atau tidaknya potongan pita DNA yang terbentuk dan data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

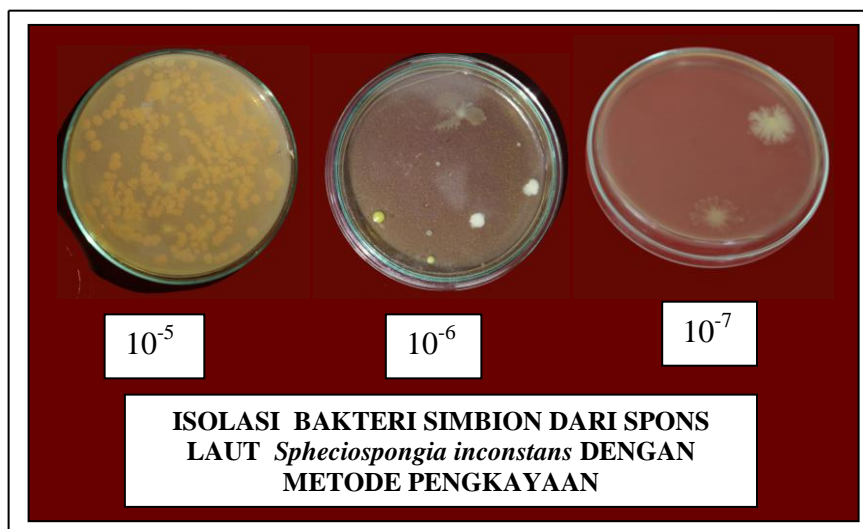
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Spons Laut

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah spons laut. Spons laut diperoleh dari perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu. Spons laut diambil untuk diisolasi dan dideterminasi. Kebenaran sampel yang akan digunakan dalam penelitian dapat dipastikan dengan cara determinasi (Rahayu dkk. 2009). Determinasi sampel spons dilakukan di Pusat Penelitian Oseanografi Ancol Jakarta menunjukkan bahwa spons laut yang diperoleh merupakan jenis *Sphaciospongia inconstans* dari keluarga *Clionadea*.

B. Isolasi Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

Bakteri simbion merupakan jenis bakteri yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya. Metabolit sekunder diperoleh dengan mengisolasi bakteri simbion. Isolasi bertujuan untuk memperoleh isolat murni bakteri simbion pada sampel spons laut. Isolat murni bakteri simbion belum berhasil didapatkan dengan metode penanaman langsung, tetapi berhasil diperoleh dengan metode pengkayaan. Isolasi dengan metode pengkayaan dilakukan selama 2 minggu pada suhu 37°C menggunakan medium *Marine Agar*. Hasil isolasi yang didapatkan dengan metode pengkayaan diambil dari 3 pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} .



Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*



Gambar 2. Hasil Isolat Murni Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

Suspensi 3 pengenceran terakhir diamati selama 2 minggu. Pada pengamatan hari ke-3 menunjukkan bahwa cawan Petri dengan pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} sudah tumbuh koloni bakteri, namun belum terlihat jelas sedangkan pada hari ke-14 semua koloni bakteri sudah terlihat jelas. Setelah masa inkubasi selama 2 minggu didapatkan lima isolat bakteri simbion (gambar 1). Murniasih dan Rasyid (2010) melaporkan bahwa bakteri simbion spons tumbuh dalam waktu 2 minggu, sehingga bakteri simbion spons laut termasuk jenis bakteri *slow grower*. Isolat bakteri simbion yang telah diperoleh selanjutnya dipindahkan ke dalam medium MA *slant* dengan diberi label masing-masing 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4, dan 7FS5 (Lampiran 17).

C. Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

Karakterisasi morfologi isolat bakteri simbion spons laut *Spheciospongia inconstans* dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan secara makroskopik meliputi warna koloni, bentuk koloni, tepian koloni, dan elevasi koloni. Setelah diamati, warna koloni yang dihasilkan yaitu oren, kuning, dan putih dengan bentuk bundar dan bundar dengan inti ditengah. Tepian isolat berbentuk licin, tak beraturan, dan berlekuk dengan elevasi cembung, elevasi seperti tetesan, timbul, dan berbukit bukit. Pengamatan secara mikroskopik dilakukan dengan menggunakan pewarna Gram. Semua isolat yang diamati secara mikroskopik memiliki bentuk sel Coccus berwarna ungu (Lampiran 17,18, dan 19).

D. Skrining Potensi Antibakteri

Skrining potensi antibakteri dilakukan dengan cara menguji aktivitas isolat bakteri simbiosis spons. Proses awal dalam skrining potensi antibakteri yaitu dengan mengkulturisasi isolat murni dalam medium PYGSB sebanyak 10 ml dan dilakukan dengan kecepatan agitasi 125 rpm pada suhu ruang selama 5 hari (Putri dkk. 2015). Hasil kultivasi kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit dengan tujuan untuk memisahkan pelet dan supernatan. Supernatan yang diperoleh dari hasil kultivasi (Tabel 1) dilanjutkan dengan pengujian potensi antibakteri. Pengujian dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan medium NA yang telah diinokulasi dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pengamatan dilakukan dengan melihat zona bening yang terbentuk sebagai indikator penghambatan bakteri dan hasil potensi antibakteri dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 1. Hasil Kultivasi Isolat Bakteri Simbiosis Spons Laut pada Medium PYGSB yang Diinkubasi Pada Suhu Ruang Selama 5 Hari dengan Agitasi 125 rpm

Kode isolat	Volume Supernatan (ml) dengan Ulangan				
	I	II	III	Rerata	SD
5FS1	6,60	7,60	6,80	7,00	0,53
6FS2	7,20	7,00	7,10	7,10	0,10
6FS3	7,40	7,40	7,40	7,40	1,09
6FS4	5,80	7,00	7,80	6,86	1,01
7FS5	7,00	6,80	6,80	6,86	0,12

Tabel 2. Diameter Zona Hambat Isolat Bakteri Simbiosis Spons Laut terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)				
	I	II	III	Rerata	SD
5FS1	5,10	5,50	6,30	5,63	0,61
6FS2	2,81	2,43	5,85	3,70	1,87
6FS3	6,75	6,53	6,55	6,61	0,12
6FS4	5,14	5,35	5,70	5,40	0,28

7FS5	2,77	4,60	5,13	4,17	1,24
------	------	------	------	------	------

Tabel 3. Diameter Zona Hambat Isolat Bakteri Simbion Spons Laut terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Kode Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)				
	I	II	III	Rerata	SD
5FS1	1,93	5,70	7,00	4,87	2,63
6FS2	2,85	1,60	6,30	3,58	2,43
6FS3	3,10	4,50	8,25	5,28	2,66
6FS4	1,65	1,95	5,90	3,16	2,37
7FS5	2,30	6,70	6,15	5,05	2,39

Berdasarkan tabel 2 dan 3 di atas, supernatan bakteri simbion spons laut menunjukkan potensi antibakteri terhadap bakteri uji. Potensi antibakteri yang paling besar ditunjukkan oleh supernatan 6FS3. Supernatan 6FS3 memiliki zona hambat rata-rata terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 6,61 mm dan terhadap *Escherichia coli* sebesar 5,28 mm. Berdasarkan zona hambat tersebut, maka isolat 6FS3 dipilih sebagai isolat yang paling potensial terhadap bakteri uji. Isolat 6FS3 selanjutnya dikultivasi pada medium dalam skala lebih besar untuk mendapatkan metabolit sekunder dari bakteri simbion spons.

E. Produksi Antibakteri Ekstrak Metabolit Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

Isolat bakteri simbion 6FS3 dikultivasi secara triplo dalam medium PYGSB sebanyak 300 ml dengan kecepatan agitasi 125 rpm selama 5 hari pada suhu ruang. Hasil kultivasi dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit dengan tujuan untuk memisahkan pelet dengan supernatan. Supernatan yang diperoleh dilanjutkan dengan proses ekstraksi menggunakan *vacum rotary evaporator*. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi cair:cair dengan pelarut etanol 96% (1:3 v/v). Tujuan dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% yaitu untuk menarik senyawa aktif yang terkandung dalam bakteri simbion spons laut sebagai antibakteri. Hasil kultivasi isolat bakteri simbion spons laut 6FS3 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Kultivasi Isolat 6FS3 Berupa Supernatan, Ekstrak Pekat, dan Ekstrak Kering dari Isolat Bakteri Symbion Spons Laut pada Medium PYGSB yang Diinkubasi Pada Suhu Ruang Selama 5 Hari dengan Agitasi 125 rpm

Ulangan	Supernatan(ml)	Ekstrak Pekat (ml)	Ekstrak Kering (g)
I	280	22	2,20
II	278	20	1,57
III	268	23	2,28
Rerata	275	21,67	2,02
SD	6,43	1,53	0,39

F. Hasil Penapisan Senyawa Aktif Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

Penapisan dilakukan untuk melihat kandungan senyawa aktif pada metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri symbion spons. Ekstrak kering bakteri symbion spons isolat 6FS3 dipilih dalam uji penapisan karena isolat tersebut merupakan isolat yang paling berpotensi baik dalam menghasilkan senyawa antibakteri. Spons laut dapat menghasilkan senyawa aktif berupa steroid, flavonoid, alkaloid, dan saponin (Rumagit dkk. 2015). Hasil uji penapisan menunjukkan bahwa metabolit sekunder bakteri symbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* positif terhadap flavonoid dan saponin tetapi negatif terhadap steroid dan alkaloid, hal tersebut ditandai dengan tidak adanya perubahan warna setelah diberikan pereaksi Lieberman-Burchard dan Mayer. Rachmat (2007) melaporkan bahwa setiap spons laut tidak selalu memiliki metabolit sekunder yang sama dengan spons lainnya, kondisi lingkungan sangat mempengaruhi pembentukan kandungan metabolit sekunder (Bergman dan Feeney 1990). Mekanisme kerja senyawa flavonoid ialah dengan menyebabkan terjadinya denaturasi protein di dalam sel bakteri (Wulandari dkk. 2009), sedangkan saponin bekerja dengan mengikat dan mengganggu kestabilan membran sel bakteri (Taufiq dkk. 2015).

Tabel 5. Hasil Penapisan Senyawa Aktif Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

Kode Isolat	Nama Senyawa	Hasil	Keterangan
6FS3	Steroid	-	-
6FS3	Flavonoid	+	Merah
6FS3	Alkaloid	-	-
6FS3	Saponin	+	Ada buih

G. Hasil Potensi Antibakteri Ekstrak Metabolit Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* dan Antibiotik Kloramfenikol

Tabel 6. Diameter Zona Hambat Isolat 6FS3 Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* terhadap *Staphylococcus aureus*

No.	Konsentrasi Ekstrak (mg/ml) X	Log X	Diameter Hambat (mm)			ΣY (mm)	Y (mm)
			Petri 1 (Y ₁)	Petri 2 (Y ₂)	Petri 3 (Y ₃)		
1	1	0	1,30	5,00	0,95	7,25	2,41
2	2	0,301	2,40	4,40	1,00	7,80	2,60
3	4	0,602	2,95	5,90	2,45	11,30	3,77
4	8	0,903	2,95	6,43	6,60	15,98	5,33
5	16	1,204	4,98	8,20	7,65	20,83	6,94

Tabel 7. Diameter Zona Hambat Isolat 6FS3 Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* terhadap *Escherichia coli*

No.	Konsentrasi Ekstrak (mg/ml) X	Log X	Diameter Hambat (mm)			ΣY (mm)	Y (mm)
			Petri 1 (Y ₁)	Petri 2 (Y ₂)	Petri 3 (Y ₃)		
1	1	0	2,65	1,55	0,90	5,10	1,70
2	2	0,301	2,80	1,95	3,75	8,50	2,83
3	4	0,602	4,83	2,15	5,10	12,08	4,03
4	8	0,903	4,80	5,70	5,25	15,75	5,25
5	16	1,204	5,45	5,75	8,55	19,75	6,58

Tabel 8. Diameter Zona Hambat Kloramfenikol terhadap *Staphylococcus aureus*

No.	Konsentrasi kloramfenikol ($\mu\text{g/ml}$) X	Log X	Diameter Hambat (mm)			ΣY (mm)	Y (mm)
			Petri 1 (Y_1)	Petri 2 (Y_2)	Petri 3 (Y_3)		
1	5	0,699	2,47	3,50	0,90	6,87	2,29
2	10	1	3,05	5,35	1,70	10,1	3,37
3	15	1,176	3,11	5,35	2,90	11,36	3,78
4	20	1,301	6,09	8,80	8,85	23,74	7,91

Tabel 9. Diameter Zona Hambat Kloramfenikol terhadap *Escherichia coli*

24

No.	Konsentrasi kloramfenikol ($\mu\text{g/ml}$) X	Log X	Diameter Hambat (mm)			ΣY (mm)	Y (mm)
			Petri 1 (Y_1)	Petri 2 (Y_2)	Petri 3 (Y_3)		
1	5	0,699	4,63	1,15	2,05	7,83	2,61
2	10	1	5,08	2,80	5,60	13,48	4,49
3	15	1,176	5,36	5,52	5,75	16,63	5,54
4	20	1,301	5,85	6,52	5,75	18,12	6,04

Ekstrak kering metabolit bakteri simbiosis laut 6FS3 yang diperoleh dibuat 5 konsentrasi yang berbeda yaitu 1, 2, 4, 8, dan 16 mg/ml. Konsentrasi tersebut memberikan zona hambat rata-rata terhadap *Staphylococcus aureus* 2,41; 2,60; 3,77; 5,33, dan 6,94 mm, serta terhadap *Escherichia coli* 1,70; 2,83; 4,03; 5,25, dan 6,58 mm. Berdasarkan data (Tabel 6 dan 7) menunjukkan bahwa konsentrasi yang paling baik berpotensi terhadap bakteri uji adalah konsentrasi 16 mg/ml dibandingkan 1, 2, 4, dan 8 mg/ml. Zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 16 mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 6,94 mm dan terhadap *Escherichia coli* sebesar 6,58 mm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi aktivitas antibakteri yang dihasilkan (Kusmiyati dan Agustini 2007).

Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kloramfenikol. Brooks dkk. (2005) menyebutkan bahwa konsentrasi hambat minimum untuk kloramfenikol yaitu 1-10 $\mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri Gram positif dan 2-5 $\mu\text{g/ml}$ terhadap Gram negatif. Hasil persamaan regresi

linear yang didapat untuk ekstrak metabolit bakteri simbion terhadap *S. aureus* $Y = 2,30 + (3,08 \times 10^{-4}) x$, kloramfenikol terhadap *S. aureus* $Y = 1,85 \times 10^{-2} + (0,35) x$, sedangkan ekstrak metabolit bakteri simbion terhadap *E. coli* $Y = 2,23 + (2,98 \times 10^{-4}) x$, kloramfenikol terhadap *E. coli* $Y = 1,84 + (0,23) x$. Dari persamaan regresi linear tersebut maka didapat potensi relatif ekstrak metabolit bakteri simbion isolat 6FS3 terhadap *Staphylococcus aureus* $1,93 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol dan terhadap *Escherichia coli* $1,57 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol (Lampiran 29 dan 30).

Isolasi DNA merupakan proses untuk memperoleh DNA dan memisahkannya dari zat-zat lain, sehingga didapat DNA murni. Proses isolasi DNA isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan protokol *Wizard Genomic DNA Purification Kit* untuk bakteri Gram positif. Isolasi DNA genom dari bakteri terdiri dari beberapa tahap yaitu kultivasi sel dalam media yang sesuai, pelisisan dinding sel, ekstraksi DNA genom, dan purifikasi DNA (4).

Pada tahap awal dari isolasi DNA, isolat bakteri harus dikultur dalam medium *Marine Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Penggunaan bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam bertujuan untuk mendapatkan jumlah sel yang memadai karena pada waktu tersebut merupakan fase eksponensial yaitu fase saat mikroorganisme tumbuh dan membelah pada kecepatan maksimum (3). Kultur bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam disentrifugasi dengan tujuan untuk memisahkan massa sel dari media pertumbuhan, massa sel akan mengendap menjadi pelet yang akan digunakan untuk proses selanjutnya.

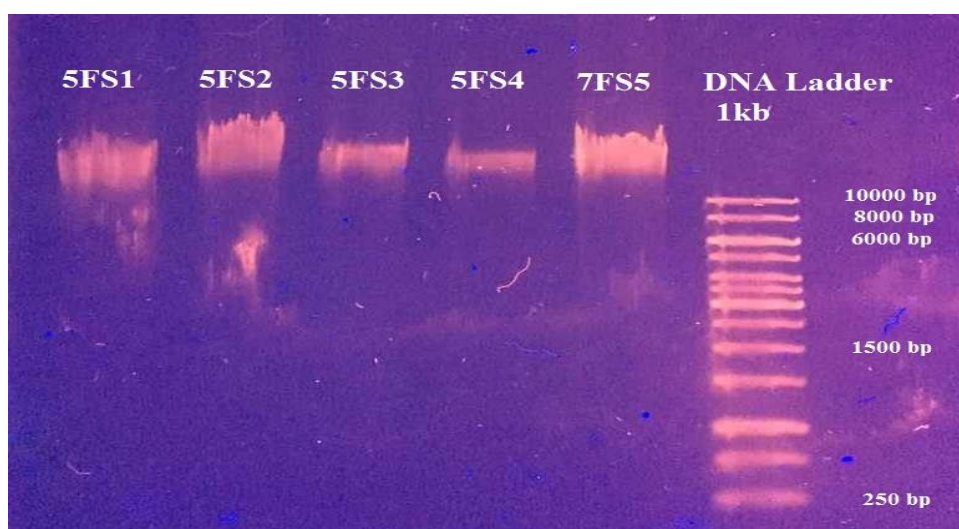
Pelet sel bakteri diresuspensi dengan EDTA, fungsi dari penambahan EDTA adalah merusak dinding sel dengan mengikat ion magnesium yang berfungsi mempertahankan integritas sel, selain itu ion magnesium juga dapat berfungsi sebagai kofaktor enzim *DNase* yang dapat mendepolimerisasi DNA menjadi komponen dasar penyusunnya yaitu nukleotida (5). Lisozim yang digunakan berguna untuk merusak dinding sel bakteri dengan cara memotong ikatan glikosidik β -1,4 yang menghubungkan *N*-asetilglukosamin dan *N*-asetilmuramat pada peptidoglikan, sehingga akan mempermudah dalam proses ekstraksi DNA (6). Penambahan lisozim dalam isolasi DNA bakteri Gram positif sangat diperlukan karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan yang tebal (7). Penggunaan *nuclei lysis solution* pada proses isolasi DNA berfungsi untuk proses ekstraksi DNA, dengan penggunaan bahan ini menyebabkan inti sel akan lisis dan DNA dapat keluar. DNA yang telah keluar dari inti

sel perlu dipurifikasi untuk mendapatkan DNA murni dan bebas dari molekul lain, sehingga pada proses isolasi DNA diperlukan bahan-bahan untuk pemurnian DNA.

Pemurnian DNA dari molekul RNA dilakukan dengan penambahan *RNase* yang merupakan enzim yang dapat merusak RNA. *Protein precipitation solution* digunakan untuk memurnikan DNA dari protein karena dapat mengendapkan protein sehingga dapat terpisah dari DNA. Isopropanol berfungsi untuk mengendapkan DNA dengan membentuk benang-benang DNA serta berfungsi untuk melarutkan lemak. Etanol 70% digunakan untuk mencuci pelet DNA sehingga didapat DNA murni dan pada proses akhir DNA diawetkan dengan DNA *rehidrasasi solution* agar tidak cepat mengalami kerusakan.

Hasil dari elektroforesis kelima DNA isolat bakteri menunjukkan terbentuknya pita DNA yang berukuran di atas 10.000 bp. Hasil tersebut menunjukkan pita DNA yang terlihat positif merupakan pita DNA genom bakteri karena pada umumnya DNA genom bakteri memiliki ukuran lebih dari 10000 bp (8). Pita DNA genom yang dihasilkan pada isolat kode 5FS1, 6FS2, dan 7FS5 terlihat sedikit membentuk *smear*, hal ini dapat terjadi karena selama proses isolasi DNA sisa dari larutan-larutan masih ikut terbawa atau dapat juga berupa DNA yang terdegradasi selama proses isolasi (9).

Hasil elektroforesis DNA genom dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis DNA Genom Isolat Bakteri Symbiont *Spheciospongia inconstans*

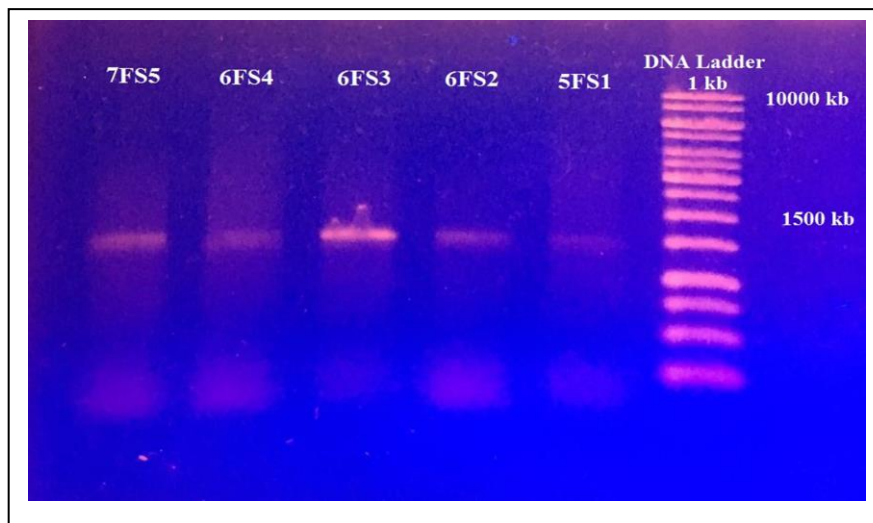
Amplifikasi DNA dilakukan untuk menggandakan jumlah sekuens DNA yang diinginkan yang dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Proses amplifikasi dilakukan terhadap gen 16S rRNA dengan menggunakan primer 27f dan 1492r.

Primer 27f merupakan primer *forward* yang akan menempel pada ujung 5'PO₄ dari untai tunggal DNA target. Primer 1492r merupakan primer *reverse* yang akan menempel pada ujung 3'OH pada untai tunggal DNA lainnya. Kedua pasang primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan sekuen komplementernya pada DNA cetakan yang telah terurai pada proses denaturasi sehingga terbentuk molekul DNA untai ganda yang stabil (10).

Tahapan amplifikasi diawali dengan *initial denaturation* yang dilakukan untuk memaksimalkan proses denaturasi cetakan DNA karena apabila denaturasi tidak sempurna akan menyebabkan kegagalan proses PCR. Pada tahap *initial denaturation* ini terjadi perenggangan DNA untai ganda. Tahap selanjutnya yaitu denaturasi, pada tahap denaturasi heliks ganda DNA akan terurai menjadi dua untai cetakan DNA tunggal (11). Setelah DNA menjadi untai tunggal terjadi proses *annealing* yaitu terjadi proses penempelan primer pada DNA cetakan yang komplemen urutan basanya. Tahap selanjutnya adalah pemanjangan (ekstensi) primer yang telah menempel pada urutan basa nukleotida DNA target, proses pemanjangan akan bergerak dari ujung 5' menuju ujung 3' pada untai tunggal DNA, sehingga terbentuk untai baru DNA. Pada tahap akhir dilakukan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit, proses ini bertujuan untuk memastikan semua untai tunggal DNA sudah mengalami pemanjangan secara sempurna (12).

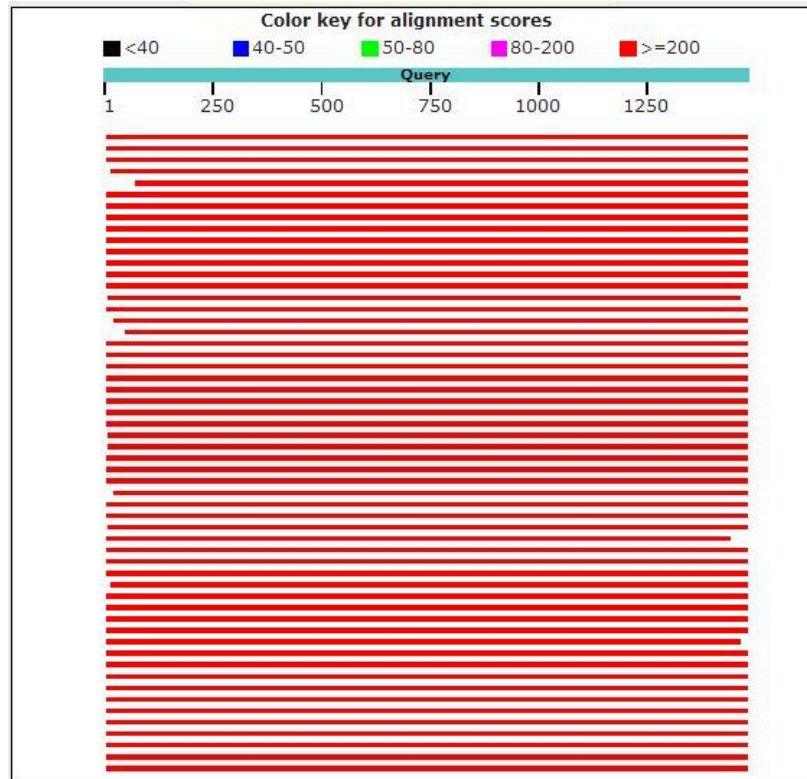
Pada penelitian ini proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yaitu *forward* primer 27f (AGA GTT TGA TCA CTG GCT CAG-3') dan *reverse* primer 1492r (5'- TAC GGC TTA CCT TGT TAC GA-3'). Kondisi PCR yang digunakan pada proses amplifikasi meliputi, *initial denaturation* yang dilakukan pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55 °C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. Pada kondisi PCR yang digunakan sebelumnya menghasilkan pita DNA terlihat *smear*, hal ini mungkin dapat terjadi karena waktu saat denaturasi dan *annealing* terlalu singkat. Waktu denaturasi berlangsung pada suhu yang sama tetapi dengan waktu yang singkat yaitu selama 30 detik, sedangkan *annealing* hanya berlangsung selama 30 detik pada suhu 50 °C. Waktu denaturasi yang cepat dapat mengakibatkan proses pemisahan untai ganda menjadi tidak sempurna dan DNA dapat mengalami renaturasi dan dapat mengakibatkan gagalnya proses PCR, sedangkan waktu *annealing* yang kurang dapat menyebabkan terbentuknya *smear* (5,12). Hasil analisis ampikon dengan menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi agarosa 1% dan

tegangan 50 volt selama 45 menit terlihat terbentuknya pita DNA tunggal dan ukuran DNA berada pada kisaran 1000-1500 bp seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 4. Hasil Elektroforesis Amplikon Isolat Bakteri Simbion *Sphaciospongia inconstans*

Data hasil sekuensing yang diterima dari 1st BASE dibuka dengan program *BioEdit*, data tersebut berupa elektroferogram yang memiliki *peak* dengan warna berbeda-beda untuk setiap basa nitrogen. Warna hijau menunjukkan basa A (Adenin), warna hitam menunjukkan basa G (Guanin), warna biru menunjukkan basa C (Sitosin), dan warna merah menunjukkan basa T (Timin). Hasil elektroferogram ketiga sampel tidak adanya *peak* basa N, yaitu *peak* yang saling menumpuk pada posisi yang sama. Data hasil sekuensing ketiga sampel menunjukkan hasil yang kurang baik pada sampel kode 5FS1 dan 6FS4 karena memiliki sekuens dengan jumlah yang sedikit yaitu kurang dari 500 pasang basa, sedangkan sampel kode 6FS3 memiliki sekuens dengan jumlah lebih dari 1000 pasang basa pada arah *forward* dan *reverse*, sehingga hanya isolat kode 6FS3 yang akan diteruskan ke tahap penyejajaran dengan program BLAST. Hasil sekuensing isolat kode 6FS3 menghasilkan sekuens lebih dari 1000 bp sedangkan isolat kode 5FS1 dan 6FS4 hanya menghasilkan sekuens kurang dari 500 bp, sehingga penyejajaran dengan program BLAST hanya dilakukan terhadap isolat kode 6FS3 dengan hasil memiliki kemiripan 100% dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10. Hasil dari penyejajaran dengan program BLASTn dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 5. Hasil *nucleotide* BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* kode 6FS3

Tampilan Gambar 3 merupakan skala yang menunjukkan tingkat kesamaan sekuens *query* yang dibandingkan dengan sekuens bakteri lain yang terdata pada *GenBank*. Hasil tersebut menunjukkan garis yang berwarna merah, yang memiliki arti bahwa jumlah kesamaan sekuens *query* dengan sekuens bakteri lain pada *GenBank* hasil penyejajaran tersebut tinggi karena ≥ 200 . Tiap garis pada gambar tersebut memiliki panjang yang berbeda-beda yang menunjukkan tingkat kesamaan sekuens *query* dengan sekuens bakteri-bakteri lain pada *GenBank*. Semakin panjang garis menunjukkan semakin tingginya kesamaan sekuens, sedangkan garis yang lebih pendek menunjukkan adanya perbedaan sekuens dan tingkat kesamaanya lebih rendah. Gambar 3 merupakan skala yang menunjukkan % *query cover* pada Gambar 4.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

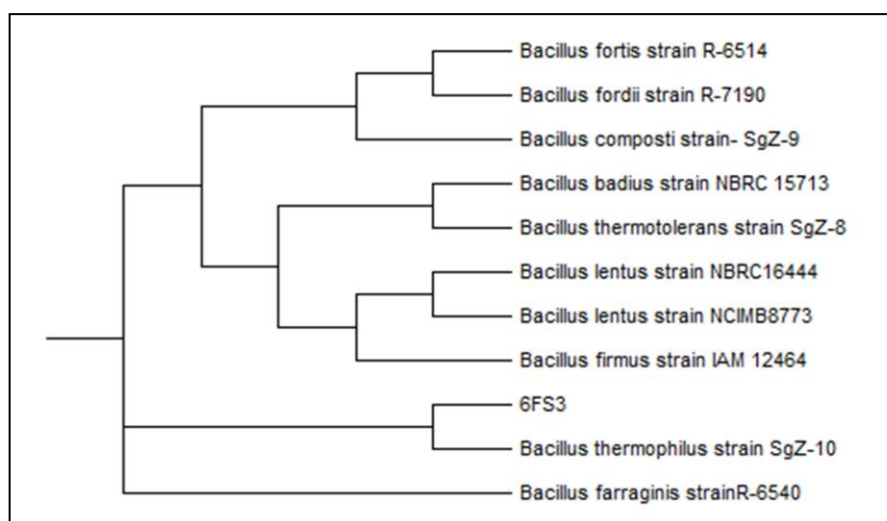
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bacillus thermophilus strain SgZ-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2704	2704	99%	0.0	100%	NR_109677.1
Bacillus composti strain SgZ-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2460	2460	99%	0.0	97%	NR_109678.1
Bacillus fortis strain R-6514 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2420	2420	99%	0.0	96%	NR_042905.1
Bacillus fordii strain R-7190 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2399	2399	98%	0.0	96%	NR_026786.1
Bacillus faraginis strain R-6540 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2335	2335	94%	0.0	97%	NR_026785.1
Bacillus badius strain NBRC 15713 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2294	2294	99%	0.0	95%	NR_112633.1
Bacillus lentus strain NBRC 16444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2289	2289	99%	0.0	95%	NR_112631.1
Bacillus lentus strain NCIM8773 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2289	2289	99%	0.0	95%	NR_040792.1
Bacillus thermotolerans strain SgZ-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2285	2285	99%	0.0	95%	NR_118458.1
Bacillus firmus strain IAM 12494 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2281	2281	99%	0.0	95%	NR_026842.1
Bacillus gothelii strain WCC 4585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2279	2279	99%	0.0	95%	NR_108491.1
Bacillus firmus strain NBRC 15308 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2279	2279	99%	0.0	95%	NR_112635.1

Gambar 6. Deskripsi Hasil *nucleotide* BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* kode 6FS3

Gambar 4 merupakan data yang mendeskripsikan kemiripan isolat bakteri simbion kode 6FS3. Data tersebut menampilkan nama spesies bakteri yang kemungkinan memiliki kemiripan dengan isolat bakteri yang diidentifikasi, *score*, % *query coverage*, *e-value* dan % *identity*. *Score* merupakan jumlah kecocokan antara sekuens sampel dengan sekuens bakteri lain yang terdata di *GenBank*, semakin tinggi *score* menunjukkan semakin tingginya tingkat kecocokan kedua sekuens. *Query cover* adalah persen yang menunjukkan berapa pasang basa nukleotida yang memiliki kesamaan dengan *database* (12). *Identity* menunjukkan berapa persen identitas atau kecocokan antara sekuens sampel dengan sekuens data yang terdapat pada *database* di *GenBank*. *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran terhadap kedua sekuens, semakin tinggi nilainya menunjukkan semakin rendahnya tingkat homologi antara kedua sekuens, sedangkan semakin rendah nilai *e-value* menunjukkan semakin tinggi tingkat homologi antar sekuens (13).

Pada data tersebut menunjukkan isolat bakteri kode 6FS3 memiliki tingkat kemiripan tinggi dengan *Bacillus thermophilus* strain SgZ-10 dengan *query cover* sebesar 99%, % *identity* sebesar 100 % dan nilai *e-value* 0. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri kode 6FS3

memiliki kemiripan yang tinggi terhadap bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10. Untuk lebih memastikan perlu ditelusuri melalui analisis filogenetik dengan mengamati posisi yang ditempatinya di antara spesies pembandingnya dengan melihat dari posisi percabangan. Analisa filogenetik dilakukan dengan melakukan penyejajaran terhadap sekuens sampel dengan sepuluh sekuens bakteri lain yang dianggap memiliki kemiripan dengan menggunakan program *ClustalX2*. Hasil penyejajaran kemudian diolah dengan menggunakan program *Treeview* untuk mendapatkan pohon filogenetik. Pohon filogenetik berguna untuk menunjukkan hubungan kekerabatan dari setiap spesies yang dilihat berdasarkan karakteristik molekuler antar spesies maupun antar strain dalam spesies yang sama (14). Hubungan kekerabatan dari isolat bakteri kode 6FS3 dapat dilihat melalui pohon filogenetik pada Gambar 5.



Gambar 7. Pohon Filogenetik Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* kode 6FS3

Berdasarkan hasil pohon filogenetik pada Gambar 5, isolat bakteri kode 6FS3 berada pada satu cabang dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10. Hal tersebut menunjukkan isolat bakteri kode 6FS3 memiliki hubungan kekerabatan dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10. Bakteri *Bacillus* spp. merupakan bakteri penghuni laut sejati yang dapat menghasilkan antibiotik (15). *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 merupakan bakteri yang termasuk kedalam bakteri Gram positif dengan bentuk batang dan koloni bakteri ini memiliki warna putih sampai kekuningan dengan tepian yang tidak beraturan. Bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 hidup pada lingkungan dengan kadar NaCl 0-6 %, dengan pertumbuhan optimum pada kadar 1% (16).

Lima isolat bakteri simbion yang telah diisolasi memiliki kode 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4 dan 7FS5 dengan isolat kode 6FS3 merupakan isolat yang memiliki potensi antibakteri tertinggi. Isolasi DNA genom dilakukan dengan protokol promega dengan hasil kelima isolat bakteri berhasil diisolasi dengan ukuran lebih dari 10.000 bp sehingga dapat diteruskan ke proses amplifikasi. Dari lima amplikon yang berukuran di antara 1000-1500 bp hanya tiga amplikon isolat kode 5FS1, 6FS3 dan 6FS4 yang dapat diteruskan ke proses sekuensing karena hanya ketiga isolat tersebut yang terdeteksi saat verifikasi oleh 1st BASE. Hasil sekuensing isolat kode 6FS3 menghasilkan sekuens lebih dari 1000 bp sedangkan isolat kode 5FS1 dan 6FS4 hanya menghasilkan sekuens kurang dari 500 bp, sehingga penyejajaran dengan program BLAST hanya dilakukan terhadap isolat kode 6FS3 dengan hasil memiliki kemiripan 100% dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10.

Bakteri yang telah diketahui spesiesnya dapat memberikan kemudahan untuk dilakukan pengembangan penelitian. Teknik rekayasa genetik merupakan salah satu bidang yang dapat dilakukan dalam pengembangan penelitian. Setelah diketahuinya spesies dari isolat bakteri tersebut maka dapat mempermudah untuk dilakukan rekayasa genetik karena telah diketahuinya urutan basa DNA. Selain itu, dengan diketahuinya spesies dari isolat bakteri maka dapat dilakukan optimasi medium yang sesuai untuk lingkungan hidupnya. Rekayasa genetik dan optimasi medium dapat dilakukan dalam upaya peningkatan produksi metabolit sekunder sehingga dapat dihasilkan senyawa bioaktif dengan potensi yang lebih baik.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa telah diperoleh 5 isolat bakteri simbion dari spons laut *Sphaciospongia inconstans* yang mempunyai aktivitas antibakteri dan isolat 6FS3 menunjukkan aktivitas terbesar dengan potensi relatif $1,93 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol terhadap *Staphylococcus aureus* dan $1,57 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol terhadap *Escherichia coli*. Salah satu isolat dengan kode 6FS3 yang merupakan isolat dengan potensi antibakteri tertinggi berhasil diidentifikasi secara molekuler berdasarkan gen 16S rRNA dengan tingkat kemiripan sebesar 100% dengan bakteri *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10.

B. Saran

Perlu dilakukan optimasi media yang sesuai untuk lingkungan tumbuh *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 serta perlu dilakukan pengembangan terhadap produksi antibakteri yang dihasilkan melalui teknik rekayasa genetika sehingga dapat dihasilkan metabolit yang lebih optimal.

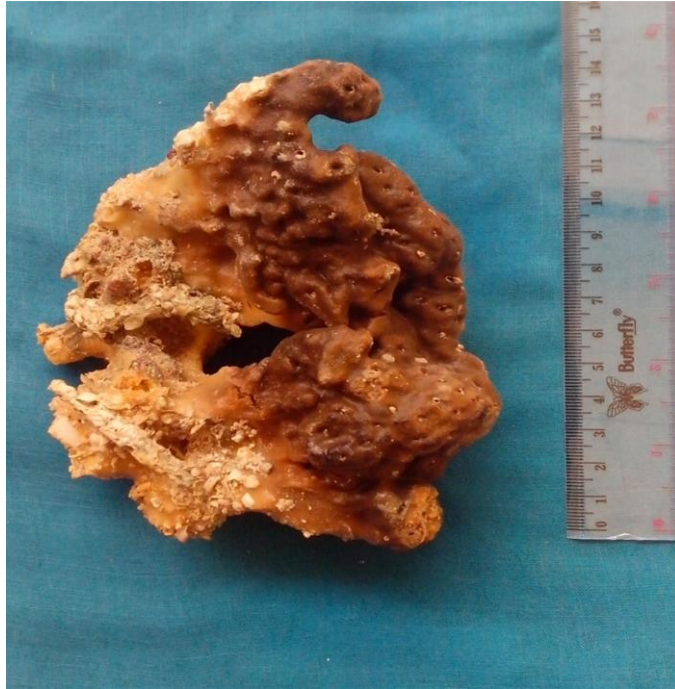
DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar H, Wahyudi AT, Yuhana M. 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis* sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. *Ilmu Kelautan* **16** (1): 35-40.
- Aris M, Sukenda, Harris E, Sukandi MF, Yuhana M. 2013. Identifikasi Molekuler Bakteri Patogen dan Desain Primer PCR. *Budidaya Perairan*. **1**(3): 43-50.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2005. Jawetz, Melnick, Adelbergs. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Salemba Medika. Surabaya. Hlm. 231-235.
- Dendy. 1887. World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org>. Diakses 8 Februari 2017.
- Fatchiyah, Arumingtyas EL, Widayarti S, Rahayu S. 2011. *Biologi Molekular-Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Malang. Hlm. 22, 48-49, 50, 55, 56.
- Felix F, Nugroho TT, Silalahi S, Octavia Y. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* sp. Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16S Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3**(2): 85-99.
- Fried GH, Hademenos GJ. 2006. *Biologi*. Edisi Kedua. Terjemahan: Tyas D. Erlangga. Jakarta. Hlm. 344.
- Hentschel U, Usher KM, Taylor MW. 2005. Marine Sponges as Microbial Fermenters. *Federation of European Microbiological Societies* **55**:167-177.
- Hickman CP, Roberts LS, Keen SL. 2010. *Integrated Principles of Zoology*. Fifteenth Edition. MC-Graw-Hill. New York. Hlm. 247, 250.
- Ismet MS, Soedharma D, Effendi H. 2011. Morfologi dan Biomassa Sel Spons *Aptosaptos* dan *Petrosia* sp. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3**(2): 153-161.
- Judianti ODW, Fiqri MM, Ansyori MK, Trimulyono G. 2014. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Demospongiae* dari Pantai Paciran Lamongan. *Jurnal Sains dan Matematika*. **2**(2): 49-53.
- Kanagasabhapathy M, Sasaki H, Nakajima K, Nagata K, Nagata S. 2005. Inhibitory Activities of Surface Associated Bacteria Isolated From the Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Microbes and Environments* **20**(3):178-185.
- Kim TK, Hewavitharana AK, Shaw PN, Fuerst JA. 2006. Discovery of a New Source of Rifamycin Antibiotics in Marine Sponge *Actinobacteria* By Phylogenetic Prediction. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3):2118-2125.

- Kimball JW. 1999. *Biologi*. Edisi Kedua. Terjemahan: Soetarmi S, Sugiri N. Erlangga. Jakarta. Hlm. 897.
- Lee YK, Lee JH, Lee HK. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Journal of Microbiology*. **39**(4): 254-264.
- Marzuki I, Noor A, Nafie NL, Djide MN. 2015. Molecular Characterization of Gene 16S rRNA Micro Symbionts in Sponge at Melawai Beach, East Kalimantan. *Marina Chimica Acta*. **16**(1): 38-46.
- Montalvo NF, Mohamed NM, Enticknap JJ, Hill RT. 2005. Novel Actinobacteria From Marine Sponges. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 29–36.
- Mujiyanto, Syam AR. 2012. Peran Terumbu Karang Buatan (TKB) Dalam Konservasi Jenis Ikan dan Upaya Pengembangannya Bagi Budidaya Perikanan. *Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indonesia*. Pusat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Sekolah Tinggi Perikanan. Jakarta. Hlm. 593-606.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Edisi kedua. IPB Press. Bogor. Hlm. 28, 63, 70.
- Ntushelo K. 2013. Identifying Bacteria and Studying Bacterial Diversity Using The 16S Ribosomal RNA Gene-Based Sequencing Techniques: A Review. *African Journal of Microbiology Research*. **7**(49): 5533-5539.
- Pangastuti A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. **7**(3): 292-296.
- Penesyau A, Kjelleberg S, Egan S. 2010. Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. *Marine Drugs*. **8**: 438-459.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta. Hlm. 80.
- Radji M. 2011. *Rekayasa Genetika*. Sagung Seto. Jakarta. Hlm. 29, 48-49, 50-52, 61, 67.
- Rahayu DA, Nugroho ED. 2015. *Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi*. Plantaxia. Yogyakarta. Hlm. 40, 65, 80-81, 87-88, 100-101.
- Rinanda T. 2011. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. **11**(3): 172-177.
- Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Sagung Seto. Jakarta. Hlm. 4.
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge Associated Microorganism: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**(2): 295-347.

Yuwono T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta. Hlm. 36, 72, 210.

Lampiran 1. Spons Laut *Spheciospongia inconstans*






(a). Spons



(b). Spons di dasar laut

Lampiran 2. Sertifikat Kloramfenikol

PT. KIMIA FARMA		29 MAR 2016			
Kimia Farma Plant Jakarta					
Jl. Rawagelam V No. 1 Kawasan Industri Pulogedung Jakarta Timur 13030					
Telp. (021) - 4609364, 4603144 Fax. (021) - 4603143					
HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM					
BAHAN BAKU					
No BTBS	GRA11-16000215	No. LAHPL	04U11-1600023R ✓		
Tgl BTBS	22-Mar-2016	Tgl Sampling	22-Mar-2016		
Gudang /	PJ - Gudang Bahan Baku	Tgl Mulai Periksa	23-Mar-2016		
Nama Barang	1003004 Chloramphenicolum, Levo	Tgl Selesai Periksa	24-Mar-2016		
		Diperiksa Oleh	AGB-Syifa		
		Tgl Periksa Ulang	24-Mar-2017 ✓		
		MFD	6-Dec-2015		
Merk/Produsen	Nanjing Baifengyu Pharm Co. Ltd - CHINA				
Jumlah Barang	6 vat @ 25 kg = 150 kg	ED	8-Dec-2020 ✓		
Jumlah Sample	0.03 Kg = 3 x 0.01 Kg (1-3)	Pemasok	PT. SATYA SAMITRA NIASATAMA		
Diambil Oleh	Anni	No. Batch lot	CH15149		
Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Unit	Method	
Pemerian	1-3 = Kristal halus seperti jarum berwarna putih kekuningan	Kristal halus seperti jarum berwarna putih hingga putih keabu-abuan atau putih kekuningan		USP 38	
identifikasi	1-3 = Memenuhi Pengujian	Memenuhi Pengujian		USP 38	
kelarutan	Memenuhi Pengujian	Memenuhi Pengujian		USP 38	
Intasi Optik Spesifik (50 mg/ml dalam 1% Alkohol absolut)		+17.0 s/d +20.0		USP 36	
H	5.12	4.5 - 7.5		USP 38	
adar	98.3	97.0 - 103.0	%	USP 38	
keterangan :	DILULUSKAN				
note	Analisa (R)				
Authorization	In Charge / Position	Signature	Date/Time	Note	
initiated by	Lucia Hendrika Spv. Pemeriksaan Bahan Baku		29/03/2016		
approved by	Dra. Budi Sadastiyi Asman Pengawasan Mutu		29/03/2016		

Lampiran 3. Komposisi dan Pembuatan Medium***Marine Agar (MA)***

Bahan:	Agar	15,0 g
	FePO ₄	0,1 g
	Pepton	5,0 g
	Ekstrak Khamir	1,0 g
	ASW	1000 ml

Cara: Semua bahan dilarutkan dalam 1000 ml ASW, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium: Isolasi bakteri simbiosis

Marine Broth (MB)

Bahan:	FePO ₄	0,1 g
	Pepton	5,0 g
	Ekstrak Khamir	1,0 g
	ASW	1000 ml

Cara: Semua bahan dilarutkan dalam 1000 ml ASW, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium: Media pengkayaan bakteri simbiosis

Nutrient Agar (NA)

Bahan:	Agar	15,0 g
	Lab-Lemco powder	1,0 g
	Pepton	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	Ekstrak Khamir	2,0 g
	Akuades	1000 ml

Cara: 28 g NA dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium: Media uji potensi bakteri simbion

Nutrient Broth (NB)

Bahan:	Lab-Lemco powder	1,0 g
	Pepton	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	Ekstrak Khamir	2,0 g
	Akuades	1000 ml

Cara: 13 g NB dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium: Media suspensi mikroba uji

Artificial Sea Water (ASW)

Bahan:	NaCl	27,5 g
	MgSO ₄	6,78 g
	MgCl ₂	5,38 g
	KCl	0,72 g
	NaHCO ₃	0,2 g
	CaCl ₂	1,4 g
	Akuades	1000 ml

Cara: Semua bahan dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

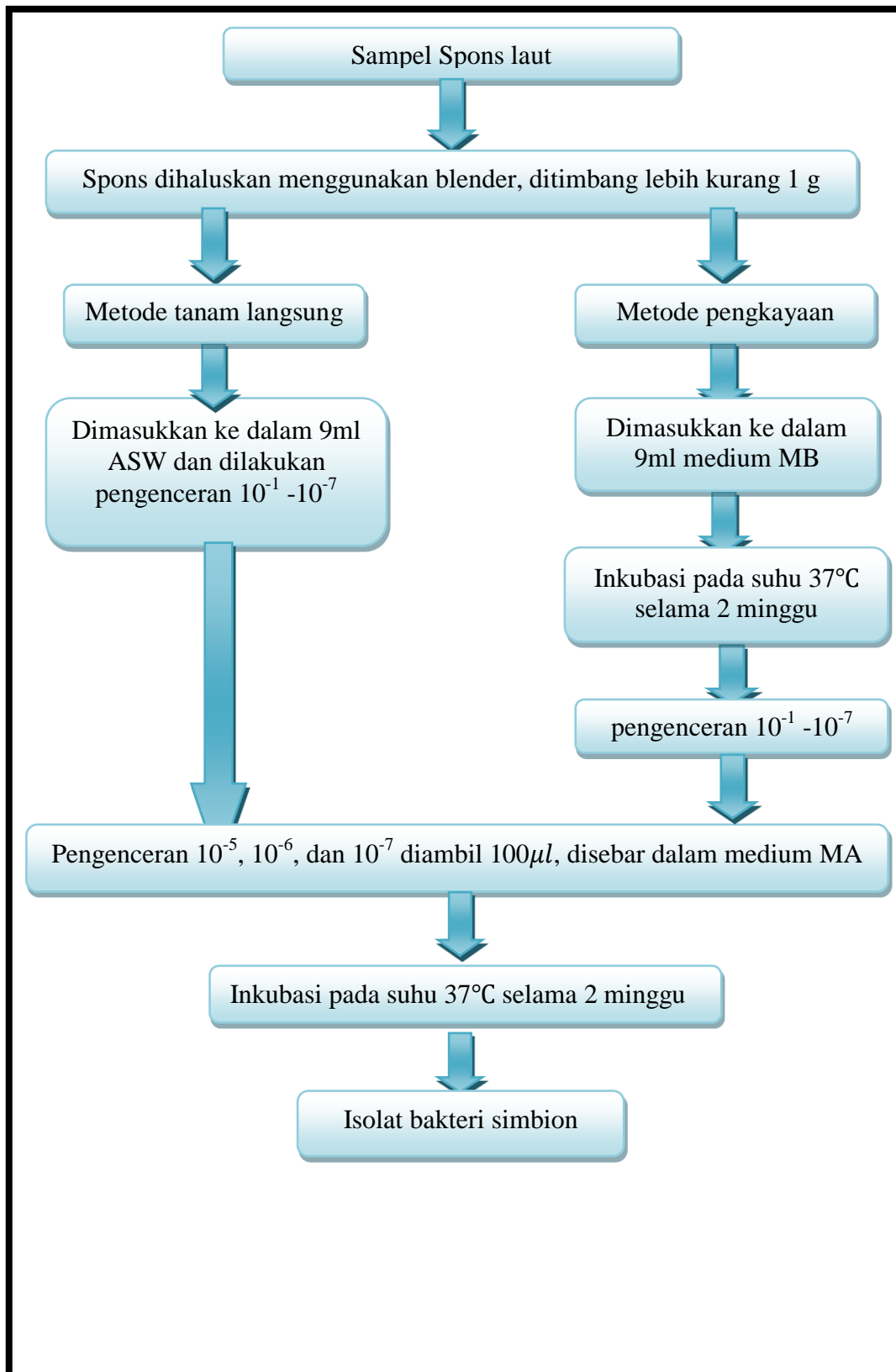
Medium: Media pengenceran bertingkat suspensi sampel spons

Peptone Yeast Glucose Seawater Broth (PYGSB)

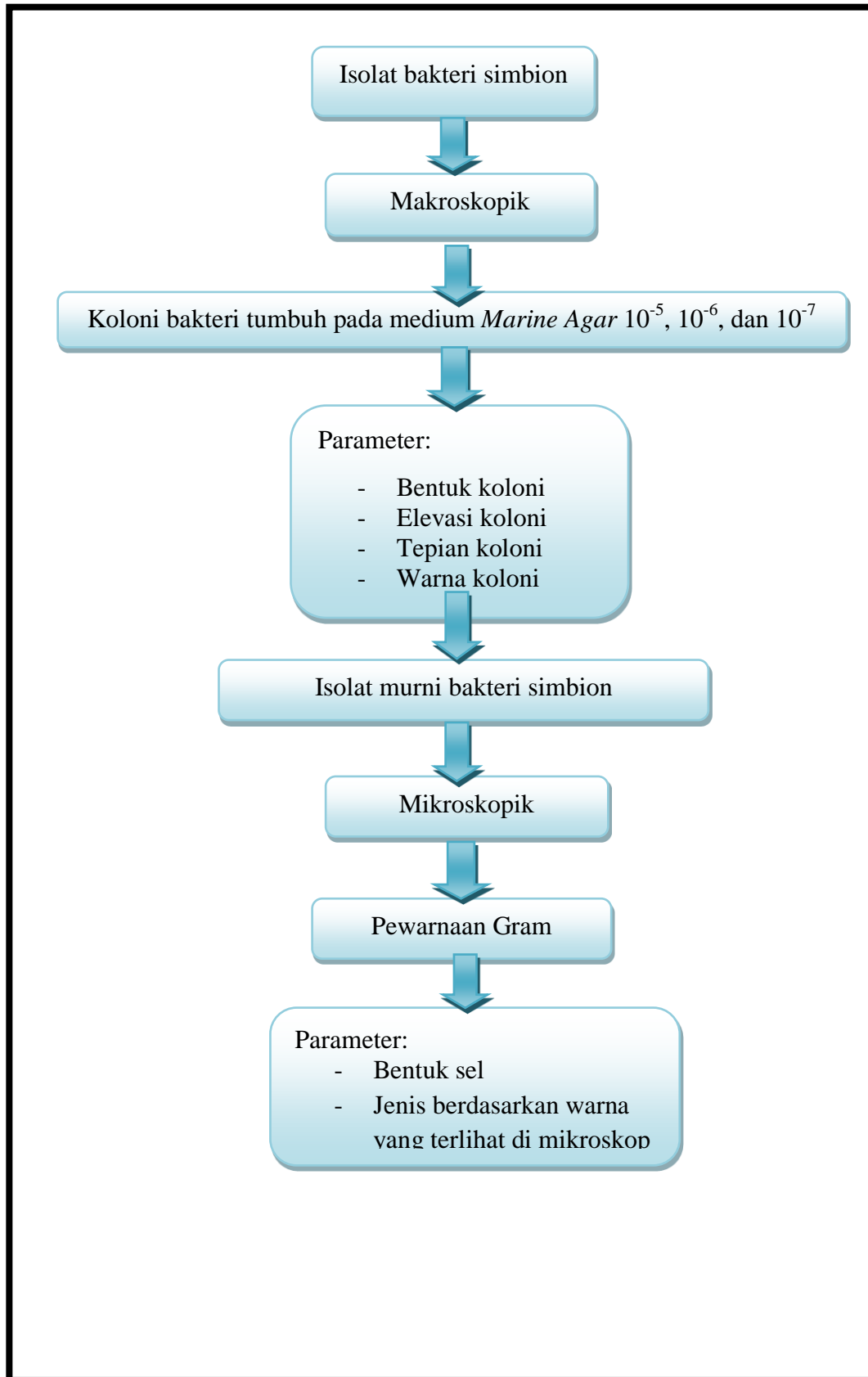
Bahan:	Glukosa	3,0 g
	Pepton	1,25 g
	Ekstrak Khamir	1,25 g
	ASW	25 ml
	Akuades ad	1000 ml

Cara: Semua bahan dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga bahan larut. Medium disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

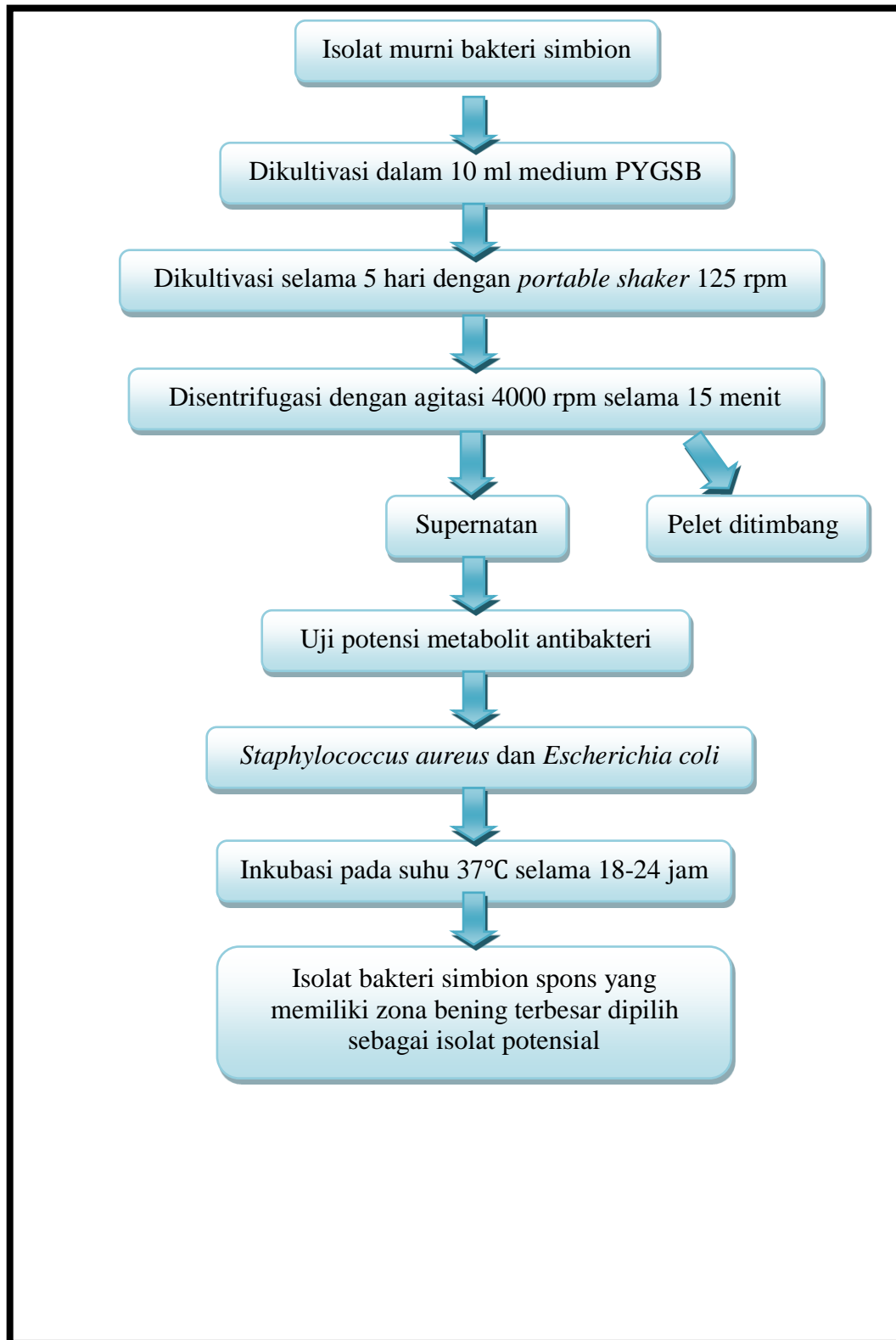
Medium: Media kultivasi isolat bakteri simbiosis spons

Lampiran 4. Skema Isolasi Bakteri Simbion

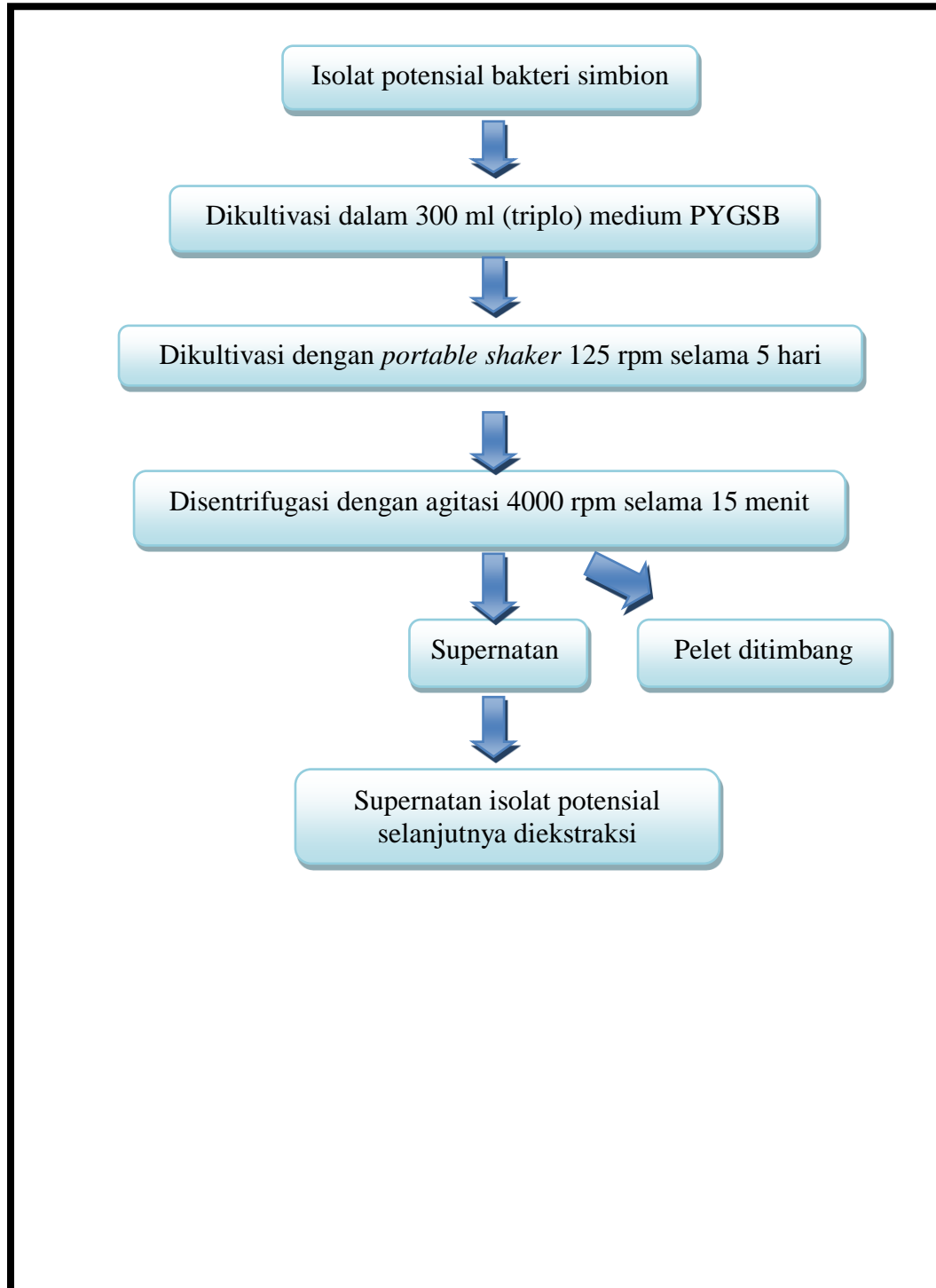
Lampiran 5. Skema Karakterisasi Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*



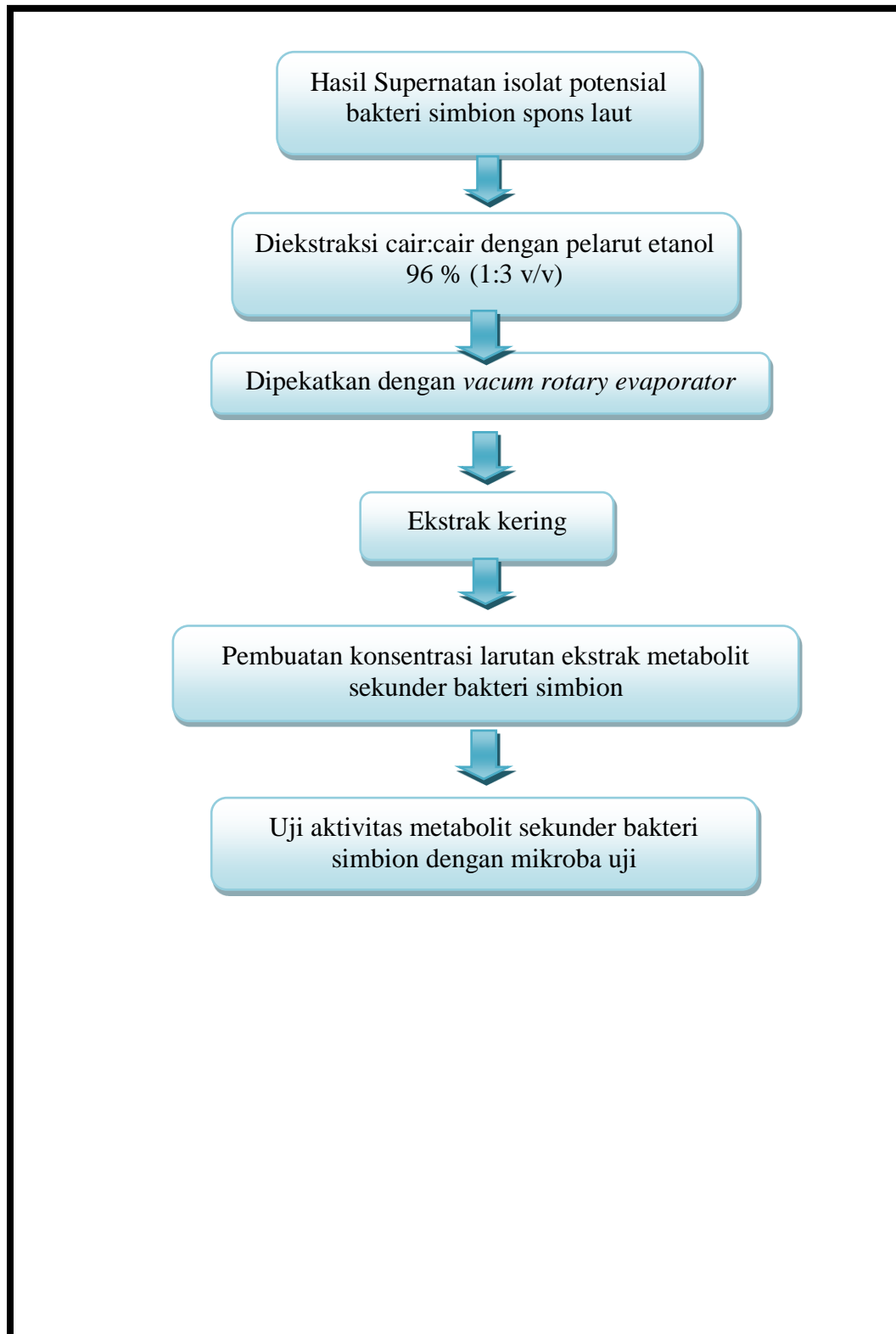
Lampiran 6. Skema kerja Skrining Potensi Antibakteri dari Isolat Murni Bakteri Symbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*



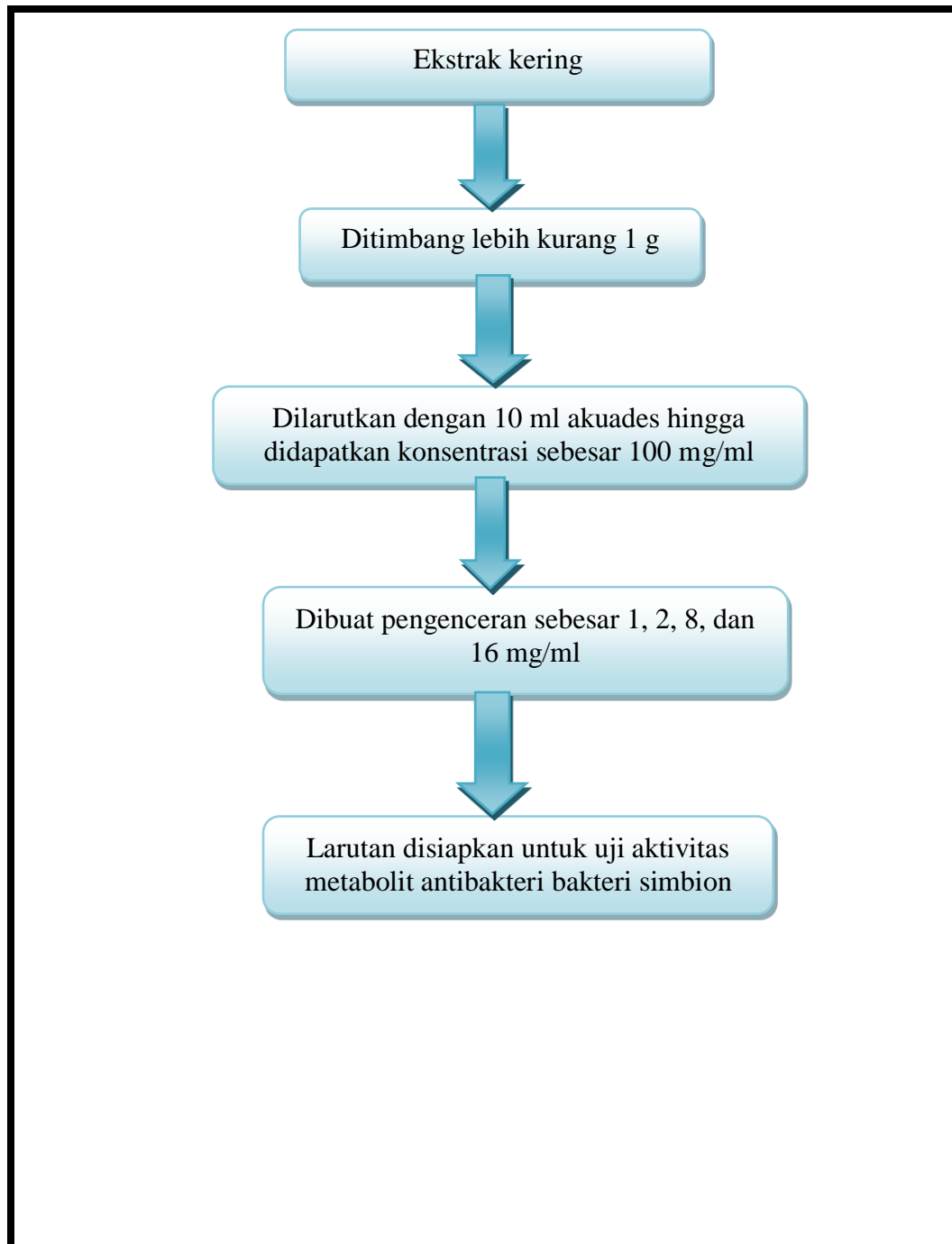
Lampiran 7. Skema Kerja Produksi Metabolit Sekunder Isolat Potensial Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

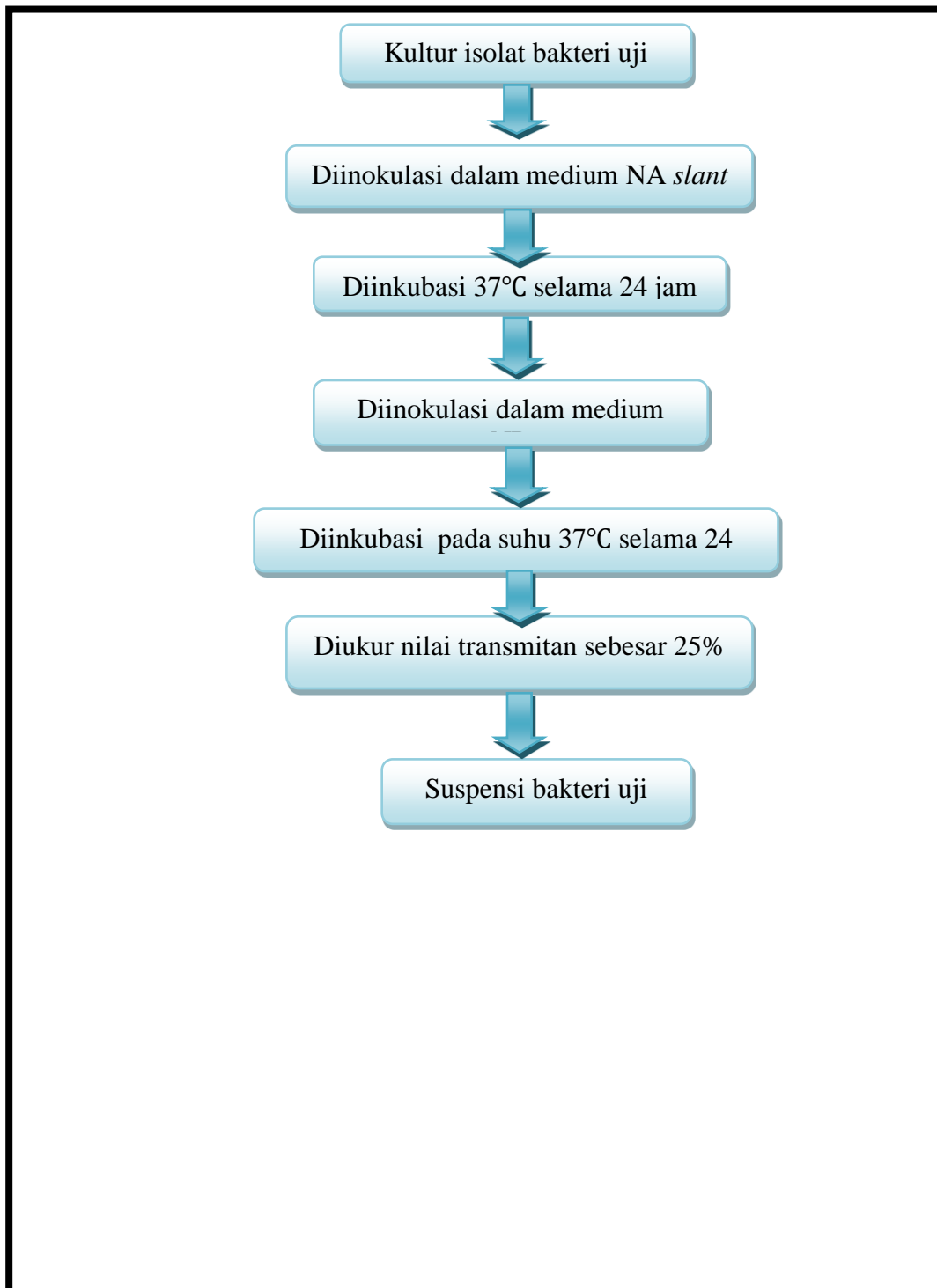


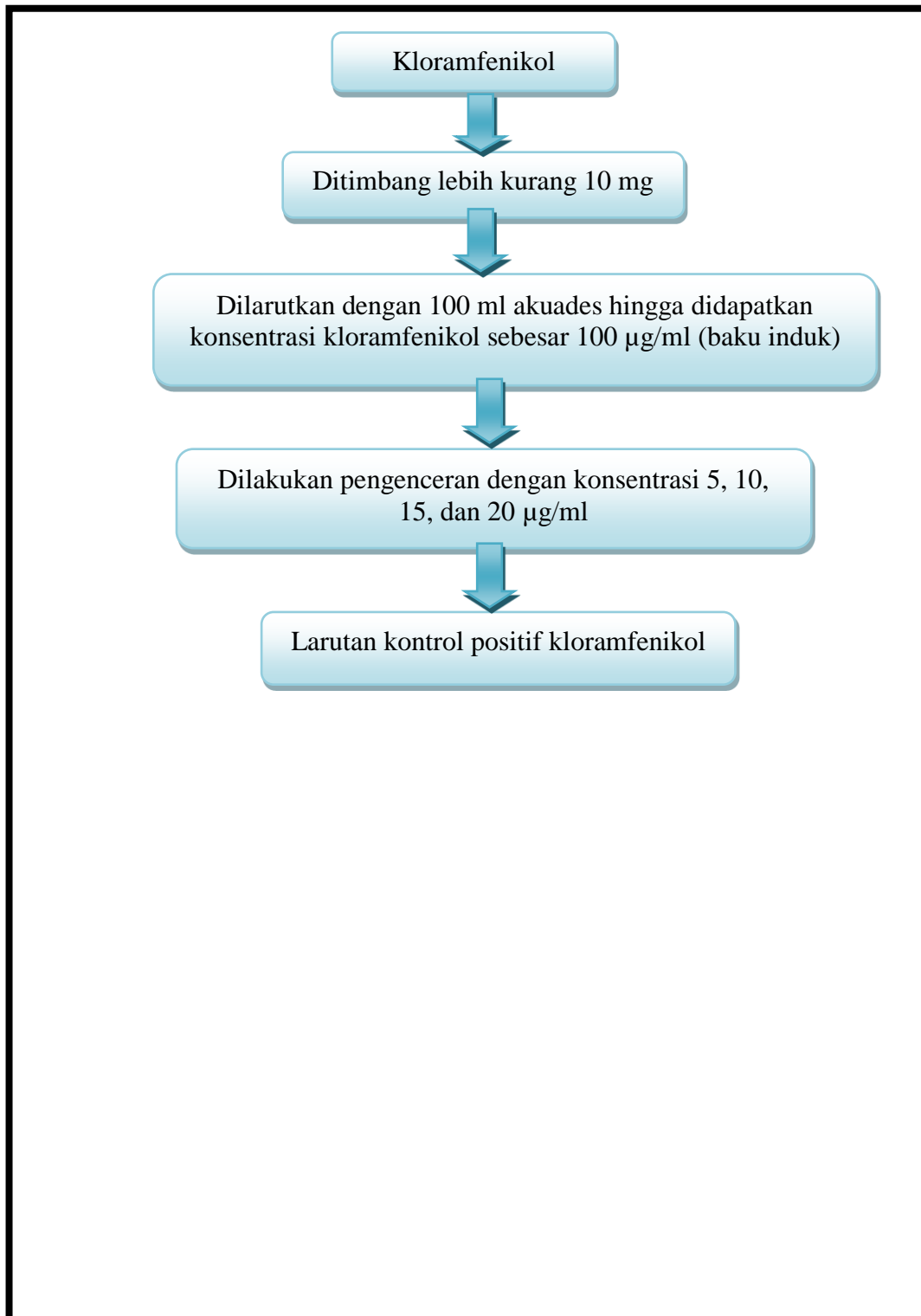
Lampiran 8. Skema Kerja Ekstraksi Hasil Kultivasi Isolat Potensial Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*



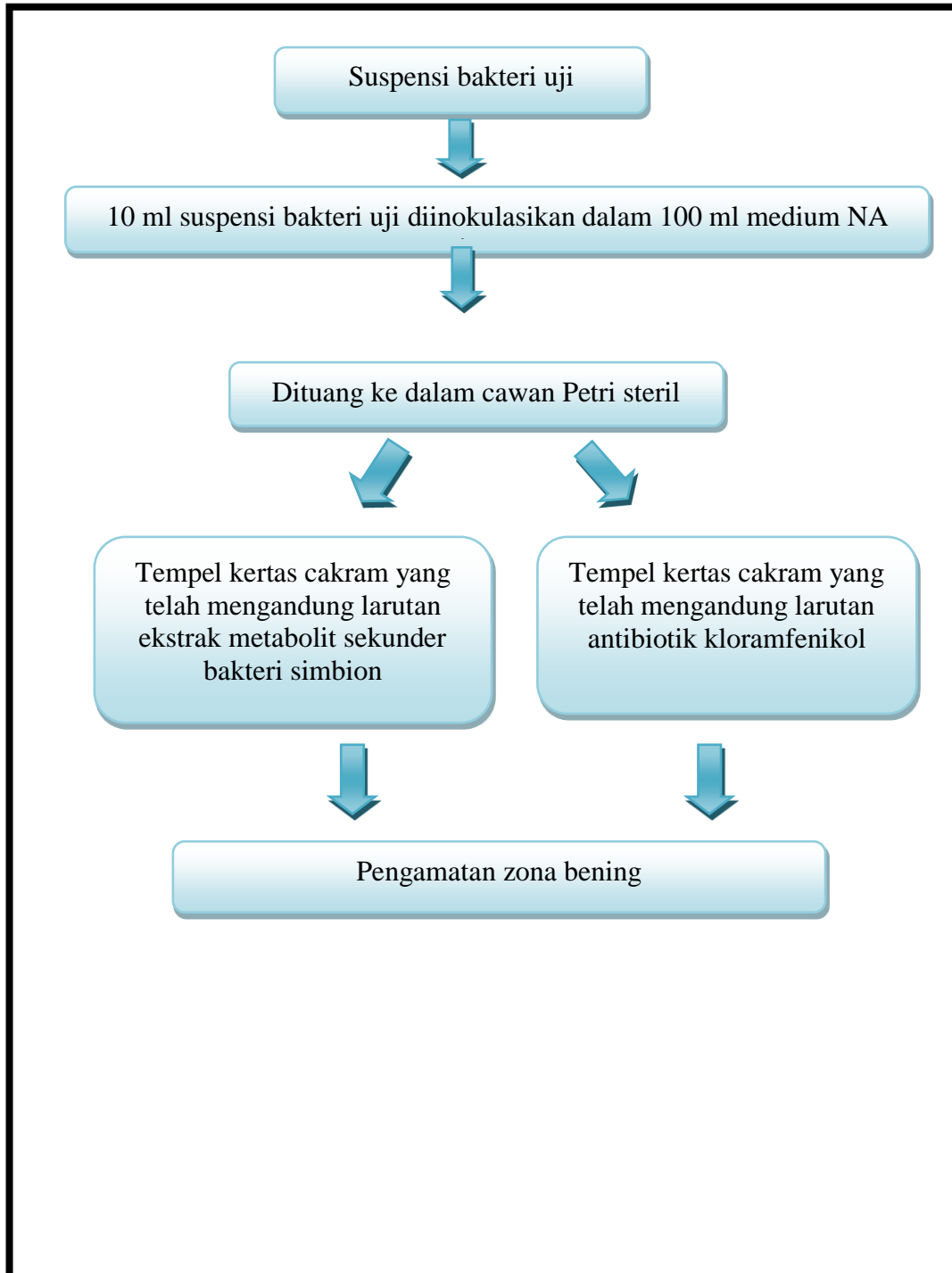
Lampiran 9. Pembuatan Larutan Konsentrasi Ekstrak Metabolit Antibakteri Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

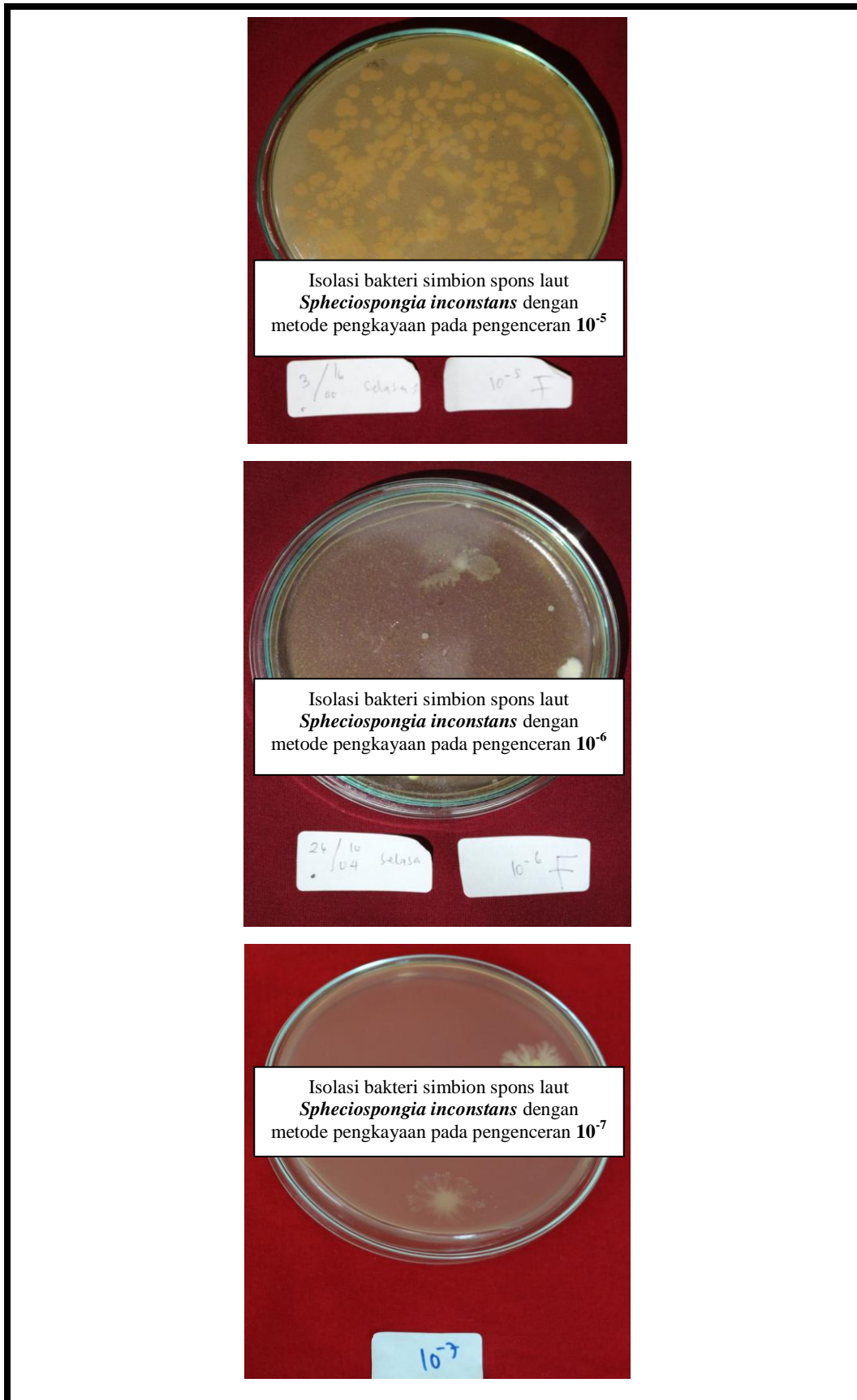


Lampiran 10. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

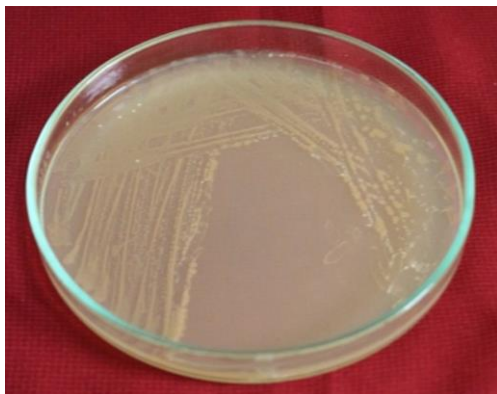
Lampiran 11. Pembuatan Larutan Pembanding Antibiotik Kloramfenikol

Lampiran 12. Skema Kerja Uji Aktivitas Metabolit Antibakteri Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* dan Antibiotik Kloramfenikol

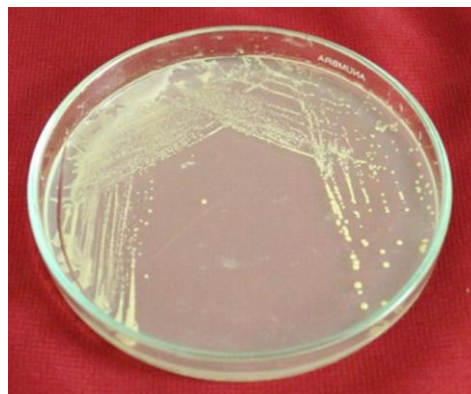


Lampiran 13. Hasil Isolasi Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*

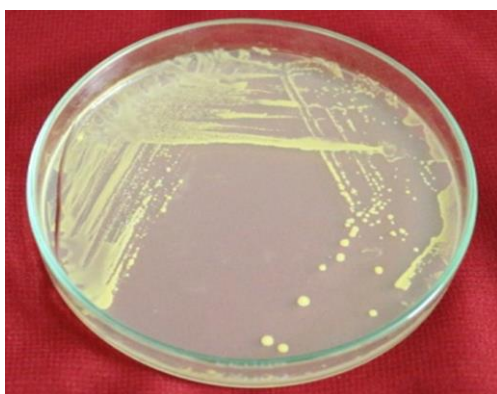
Lampiran 14. Hasil Karakterisasi Makroskopis Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*



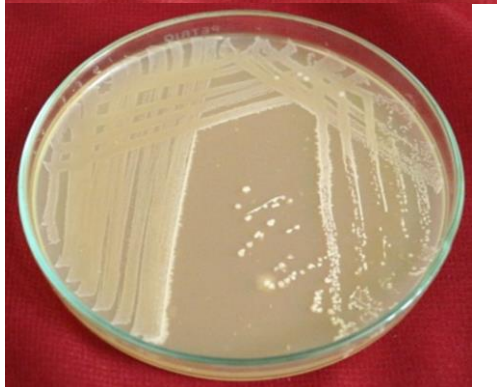
(a) ISOLAT 5FS (1)



(b) ISOLAT 6FS (2)

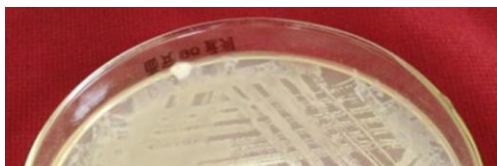


(c) ISOLAT 6FS (3)

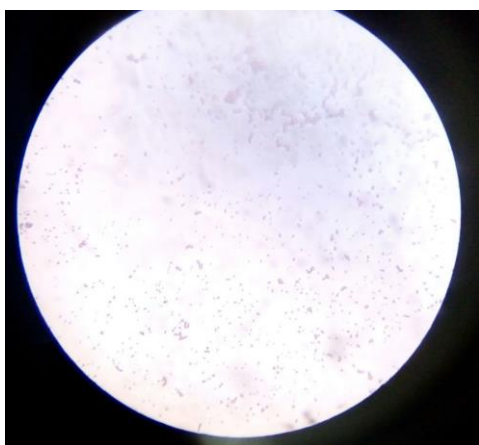


1 2 3 4 5

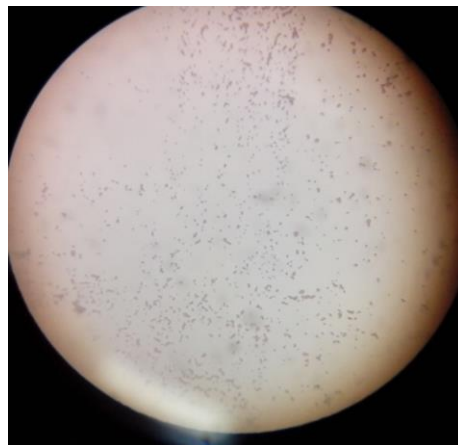
(d) ISOLAT 6FS (4)



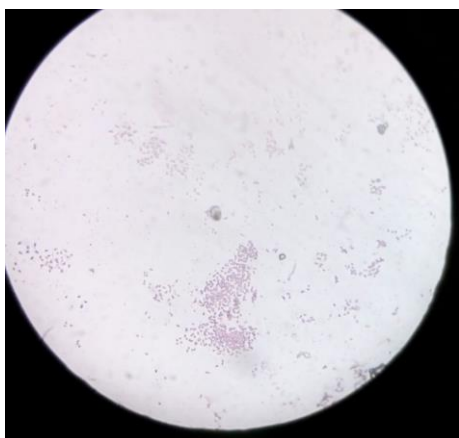
Lampiran 15. Hasil Karakterisasi Mikroskopis Isolat Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*



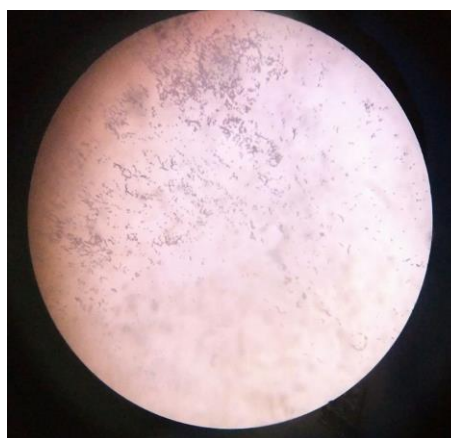
5FS1



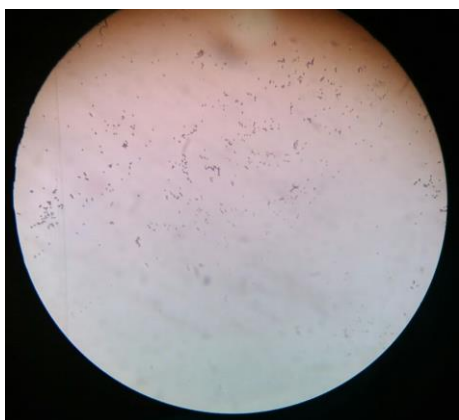
6FS2



6FS3



6FS5

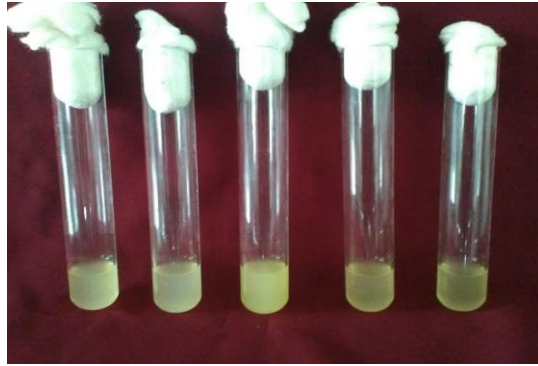


7FS5

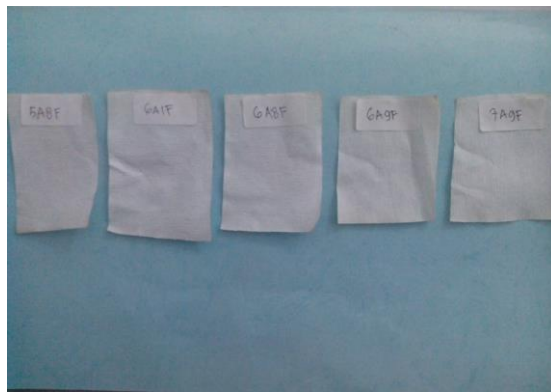
**Lampiran 16. Pengamatan Morfologi Isolat Bakteri Simbion Spons Laut
*Sphaciospongia inconstans***

No	Kode isolat	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi
1	5FS1	Orange	Bundar dengan inti ditengah	Licin	Cembung
2	6FS2	Kuning	Bundar	Licin	Seperti tetesan
3	6FS3	Kuning	Bundar dengan inti ditengah	Licin	seperti tetesan
4	6FS4	Putih	Bundar dengan tepian menyebar	Tidak beraturan	Timbul
5	7FS5	putih	Bundar dengan tepian menyebar	Berlekuk	Berbukit bukit

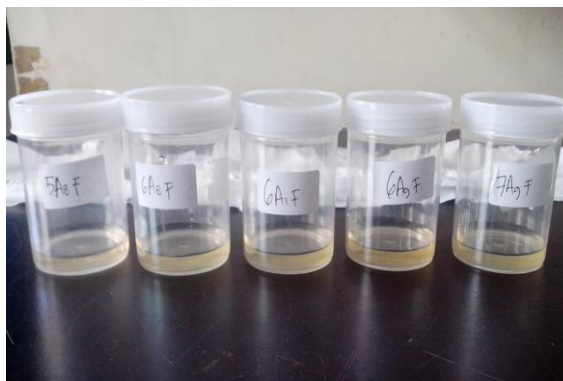
Lampiran 17. Medium Kultivasi dan Hasil Kultivasi Metabolit Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*



(a). Isolat bakteri simbion dalam 10 ml medium PYGS setelah dikultivasi

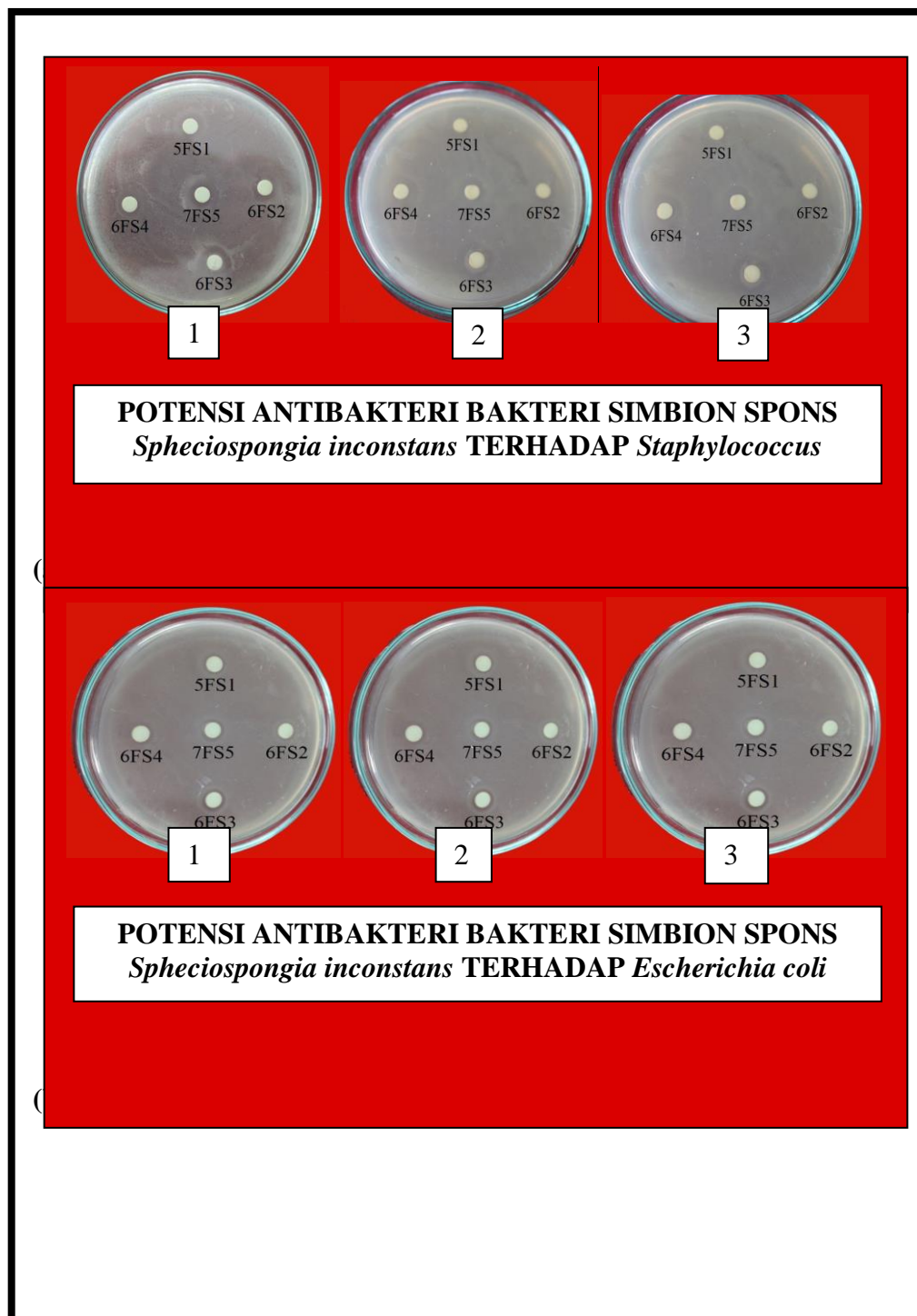


(b). Pelet kering bakteri simbion



(c). Supernatan isolat bakteri simbion

Lampiran 18. Hasil Potensi Antibakteri Supernatan Bakteri Symbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*



Lampiran 19. Hasil Produksi Metabolit Antibakteri Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans*

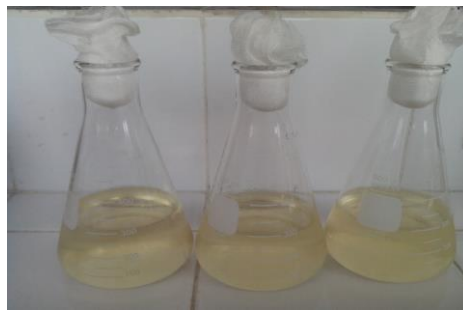


(a). Medium PYGSB 300 ml

(b). Hasil sentrifugasi



(c). Pelet kering



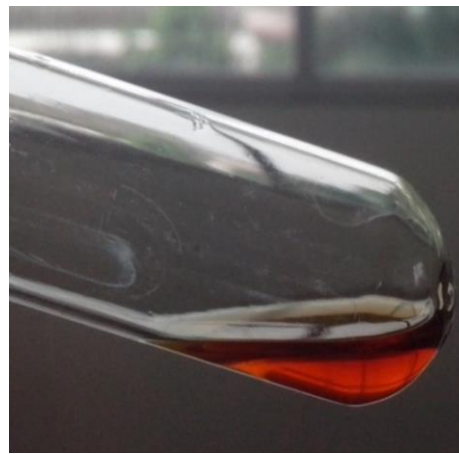
(d). Supernatan



Lampiran 20. Hasil Penapisan Senyawa Aktif dari Metabolit Sekunder Isolat 6FS3 Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans*



(a). Hasil uji penapisan steroid dan alkaloid

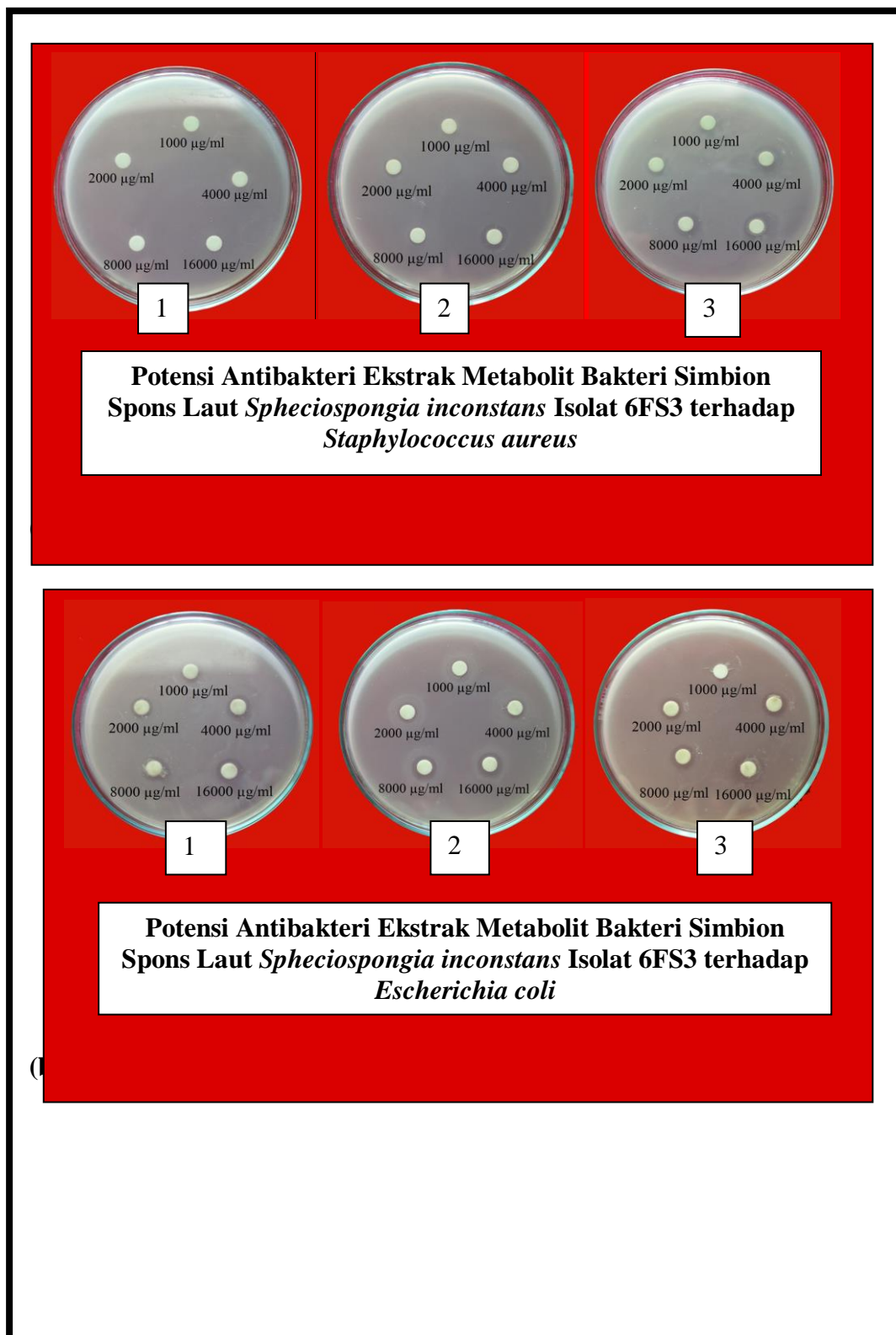


(b). Hasil uji penapisan flavonoid

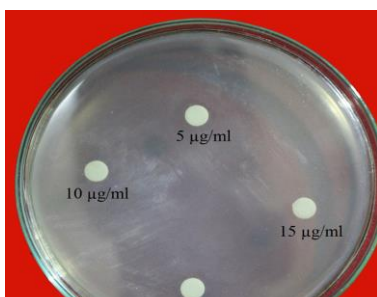


(c). Hasil uji penapisan saponin

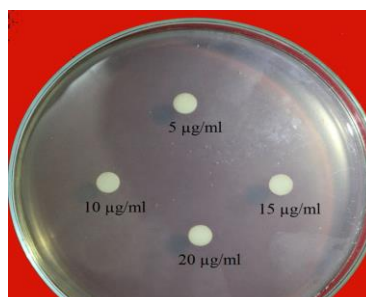
Lampiran 21. Diameter Zona Hambat Ekstrak Metabolit Bakteri Simbion Spons Laut *Spheciospongia inconstans* Isolat 6FS3 terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*



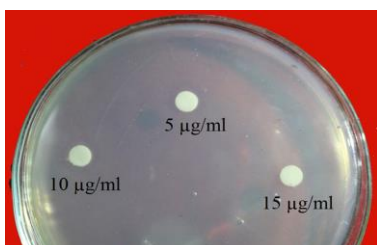
Lampiran 22. Diameter Zona Hambat Antibiotik Kloramfenikol terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*



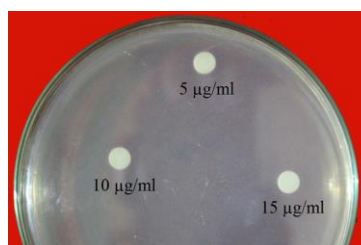
Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Staphylococcus aureus*



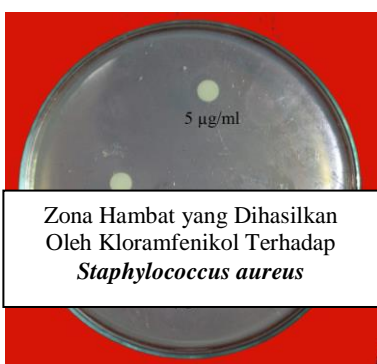
Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Escherichia coli*



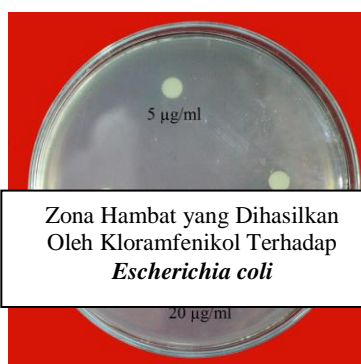
Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Staphylococcus aureus*



Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Escherichia coli*

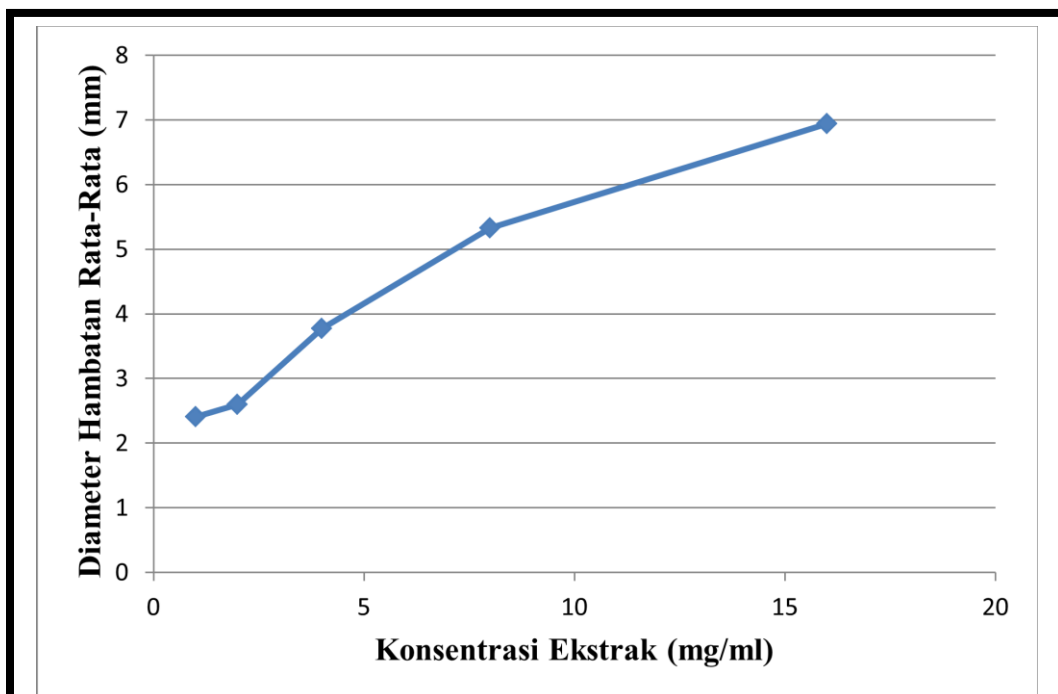


Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Staphylococcus aureus*

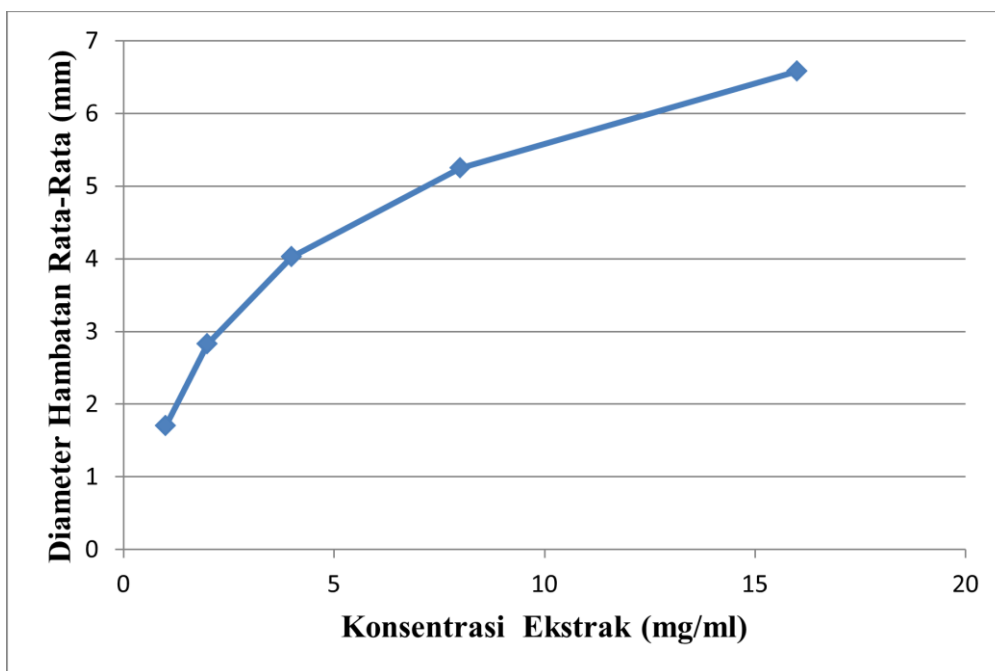


Zona Hambat yang Dihasilkan Oleh Kloramfenikol Terhadap *Escherichia coli*

Lampiran 23. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Metabolit Bakteri Symbion Spons Laut *Sphecospongia inconstans* Isolat 6FS3 Terhadap Zona Hambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

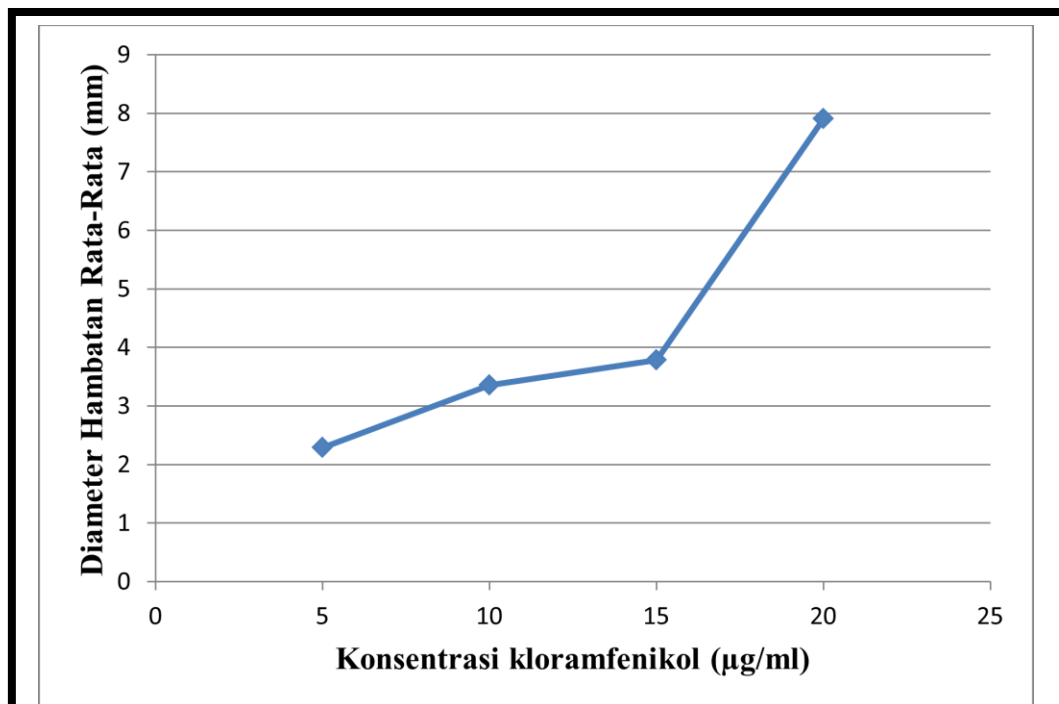


(a). Zona Hambat terhadap *Staphylococcus aureus*

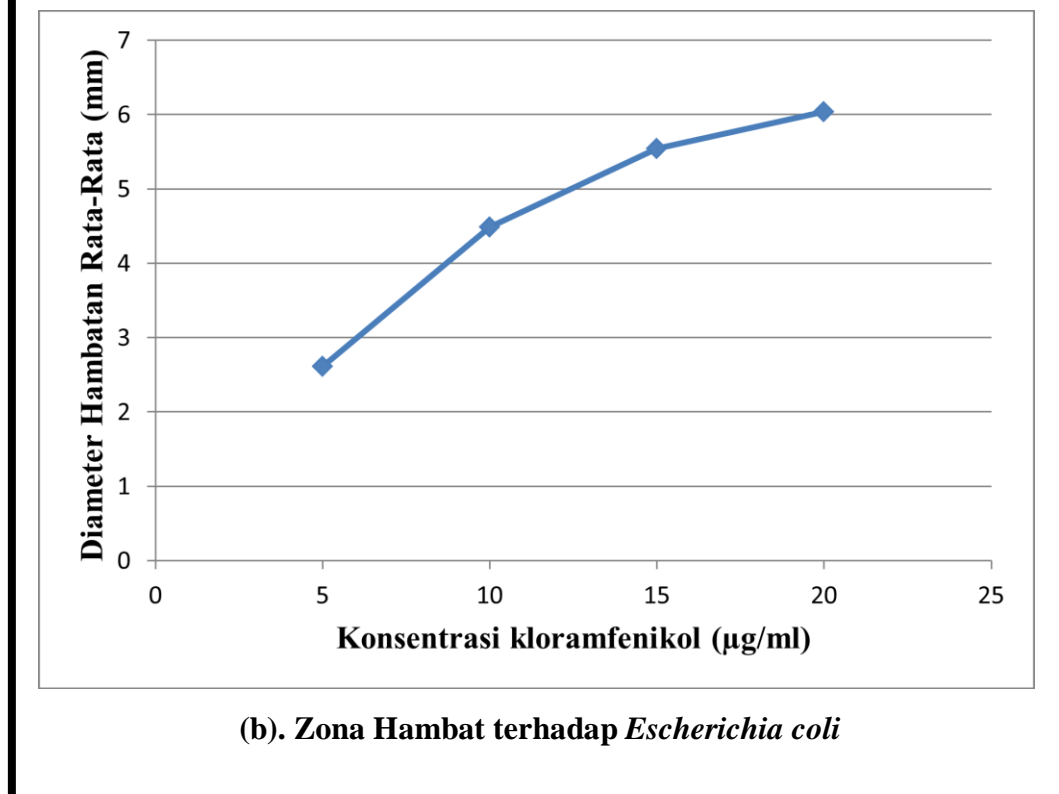


(b). Zona Hambat terhadap *Escherichia coli*

Lampiran 24. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Kloramfenikol terhadap Zona Hambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

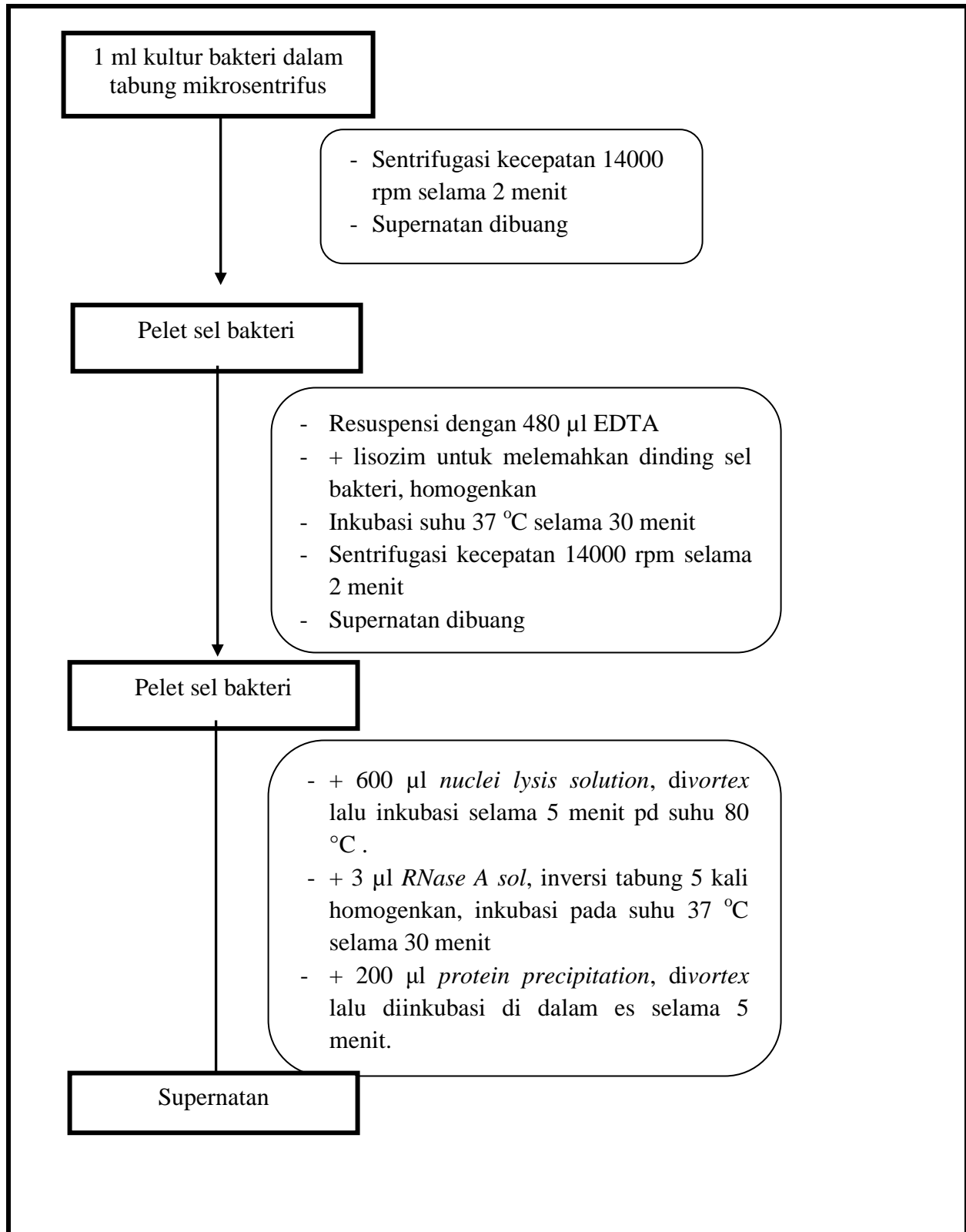


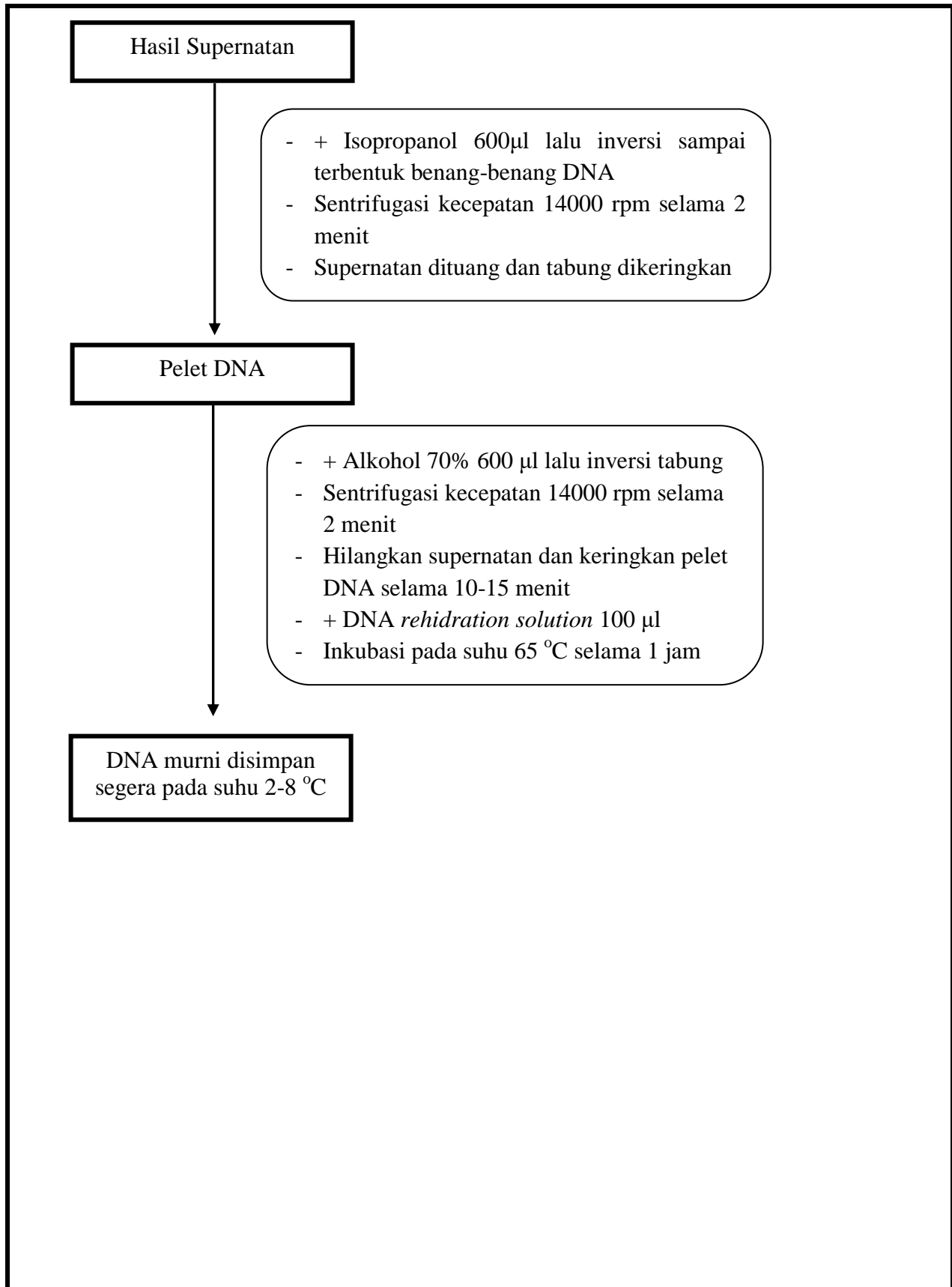
(a). Zona Hambat terhadap *Staphylococcus aureus*

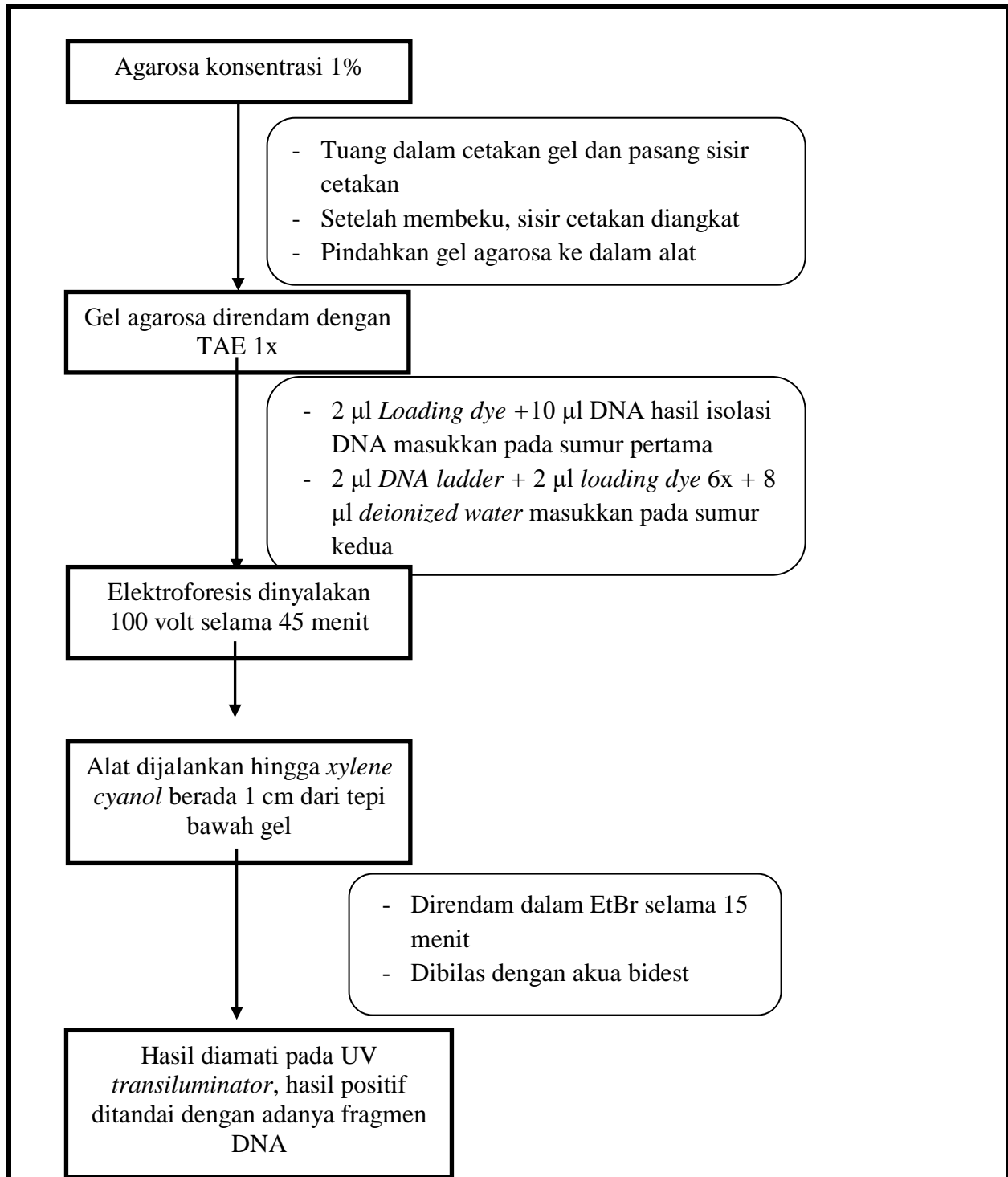


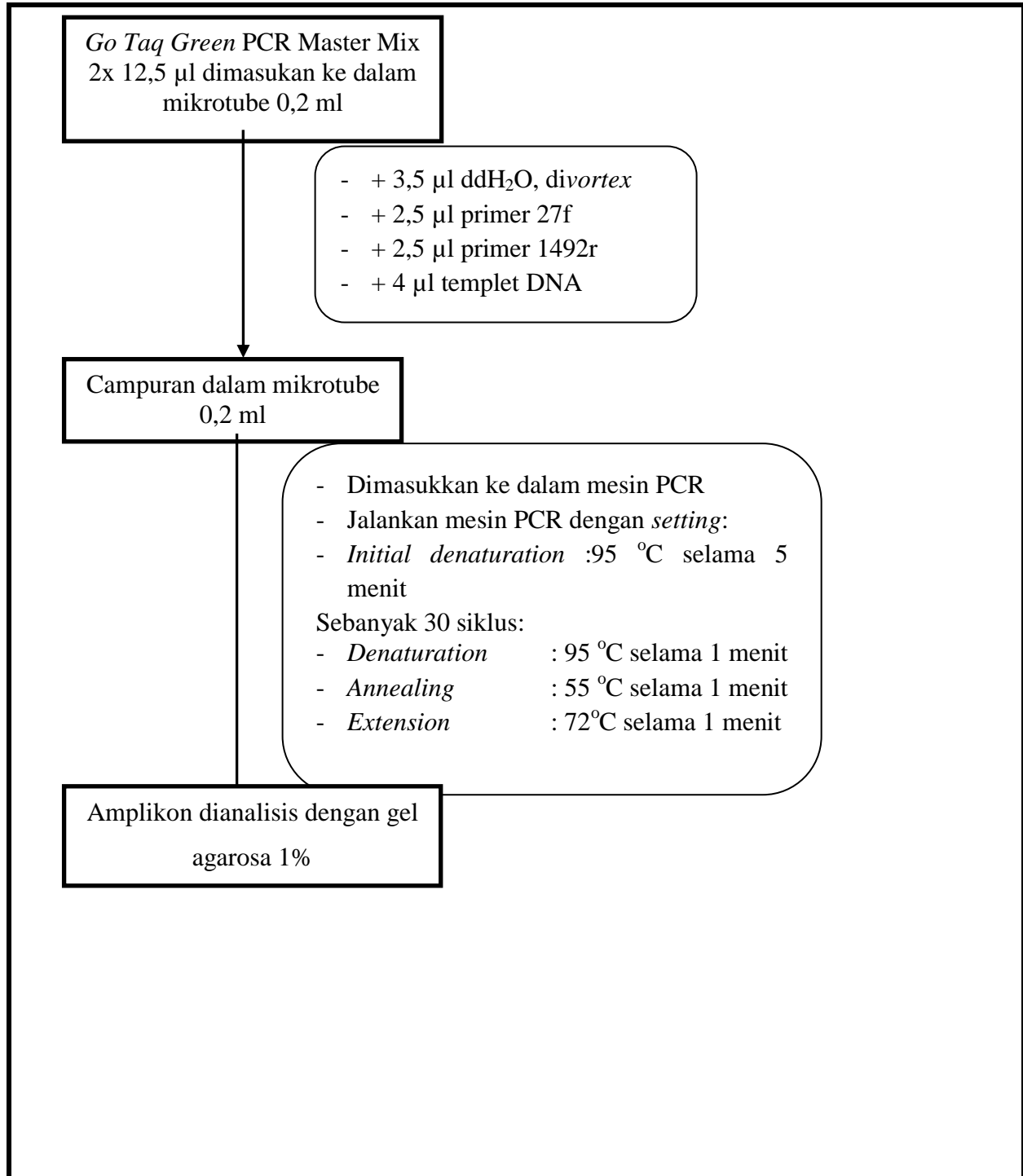
(b). Zona Hambat terhadap *Escherichia coli*

Lampiran 25. Skema Kerja Isolasi DNA Genom





Lampiran 26. Skema Kerja Analisis DNA Genom dengan Elektroforesis

Lampiran 27. Skema Kerja Proses Amplifikasi DNA dengan PCR

Lampiran 28. Perhitungan Perbandingan Konsentrasi Zat Uji dengan Antibiotik Standar (Perhitungan Potensi Relatif)

1. Perhitungan Potensi Relatif Ekstrak Metabolit Bakteri Symbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* Isolat 6FS3 terhadap *Staphylococcus aureus*

Data yang telah diperoleh dianalisa dengan regresi linear. Persamaan yang terbentuk adalah:

$$\text{Diketahui: } Y_1 = 2,30 + (3,08 \times 10^{-4}) X \quad (\text{untuk ekstrak})$$

$$Y_2 = 1,85 \times 10^{-2} + (0,35) X \quad (\text{untuk kloramfenikol})$$

Dari persamaan regresi linear di atas dapat digunakan untuk mencari kekuatan ekstrak metabolit bakteri symbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* apabila dibandingkan dengan kloramfenikol.

Diketahui ΣY ekstrak metabolit 3,97 mm dan didapatkan \bar{Y} rata-rata ekstrak metabolit = 4,21 mm, lalu dimasukkan ke dalam persamaan:

- Untuk ekstrak metabolit bakteri symbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* isolat 6FS3

$$y_u = a + bx_u$$

$$4,21 = 2,30 + (3,08 \times 10^{-4}) X$$

$$X_u = 6201,298 \mu\text{g/ml}$$

- Untuk kloramfenikol

$$y_u = a + bx_s$$

$$4,21 = 1,85 \times 10^{-2} + (0,35) X$$

$$X_s = 11,9757 \mu\text{g/ml}$$

Untuk mendapatkan nilai potensi relatif dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{Nilai potensi relatif} = \frac{x \text{ standar}}{x \text{ uji}}$$

$$= \frac{11,9757 \mu\text{g/ml}}{6201,298 \mu\text{g/ml}}$$

$$= 1,93 \times 10^{-3} \text{ kali kloramfenikol}$$

- Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak metabolit bakteri symbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* isolat 6FS3 mempunyai potensi relatif sebesar $1,93 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol.

2. Perhitungan Potensi Relatif Ekstrak Metabolit Bakteri Simbion Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* Isolat 6FS3 terhadap *Escherichia coli*

Data yang telah diperoleh dianalisa dengan regresi linear. Persamaan yang terbentuk adalah:

$$\text{Diketahui: } Y_1 = 2,23 + (2,98 \times 10^{-4}) X \quad (\text{untuk ekstrak})$$

$$Y_2 = 1,84 + (0,23) X \quad (\text{untuk kloramfenikol})$$

Dari persamaan regresi linear di atas dapat digunakan untuk mencari kekuatan ekstrak metabolit bakteri simbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* apabila dibandingkan dengan kloramfenikol.

Diketahui ΣY ekstrak metabolit 3,67 mm dan didapatkan \bar{Y} rata-rata ekstrak metabolit = 4,08 mm, lalu dimasukkan ke dalam persamaan:

- Untuk ekstrak metabolit bakteri simbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* isolat 6FS3

$$y_u = a + bx_u$$

$$4,08 = 2,23 + (2,98 \times 10^{-4}) X$$

$$X_u = 6208,0536 \mu\text{g/ml}$$

- Untuk kloramfenikol

$$y_u = a + bx_s$$

$$4,08 = 1,84 + (0,23) X$$

$$X_s = 9,7391 \mu\text{g/ml}$$

Untuk mendapatkan nilai potensi relatif dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{Nilai potensi relatif} = \frac{x \text{ standar}}{x \text{ uji}}$$

$$= \frac{9,7391 \mu\text{g/ml}}{6208,0536 \mu\text{g/ml}}$$

$$= 1,57 \times 10^{-3} \text{ kali kloramfenikol}$$

- Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak metabolit bakteri simbion spons laut *Sphaciospongia inconstans* isolat 6FS3 mempunyai potensi relatif sebesar $1,57 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol.

Lampiran 29. Alat Penelitian**(a). Sentrifugator****(b). Rotary Evaporator****(c). Inkubator****(d). Spektrofotometer transmittan****(e). Autoklaf****(f). Oven**



(g). Vortex



(h). Mikroskop



(i). Portable shaker