

Identifikasi Molekuler Bakteri Simbion Spons Laut *Haliclona (Reinera) sp.* Sebagai Antibakteri

Ani Pahriyani*, Fitriana Mifthahul Haq, Priyo Wahyudi

ABSTRACT: Bacterial symbiont known to be able to produce secondary metabolites, that its utilization as the source of bioactive compounds is increase. Study of Mulyaningsih (2016) has reported that the bacterial symbiont of sponge *Sphaciospongia inconstans* from Harapan Island, Kepulauan Seribu has a potency to produce antibacterial compounds. The aim of this study was to identify species of symbiont bacterial isolates of sponge of *Sphaciospongia inconstans* which can produce antibacterial substance based on 16S rRNA gene. Total DNA of the five bacterial isolates from previous study were isolated using Wizard Genomic DNA Purification Kit, then amplified the 16S rRNA gene using primers 27f and 1492r. The amplification results were sequenced and aligned using BLAST program. The results of this study only succeeded in identifying isolate 6FS3 of bacterial symbiont that had an 100% similarity with bacteria *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10.

Keywords: Bacterial symbiont, marine spons *Sphaciospongia inconstans*, antibacterial, PCR gen 16S rDNA

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.

Kata Kunci: Bakteri simbion, spons laut *Sphaciospongia inconstans*, antibakteri, PCR gen 16S rRN

Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA
Jakarta

Korespondensi :

Ani Pahriyani
anipahriyani@uhamka.ac.id

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang beriklim tropis dengan tingkat infeksi terhadap suatu bakteri yang tinggi sehingga penggunaan antibiotik masih paling dominan dalam pelayanan kesehatan (1). Saat ini resistensi bakteri terhadap antibiotik di Indonesia terus meningkat, hal itu mendorong para peneliti untuk mencari senyawa baru antibiotik terutama dari bahan alam. Indonesia diketahui memiliki kekayaan biota laut yang melimpah salah satunya adalah spons laut. Mujiyanto dan Amran menyatakan penyebaran spons di perairan Pulau Harapan Kepulauan Seribu cukup luas, sehingga eksplorasi terhadap spons laut masih memberikan peluang yang cukup tinggi. Spons laut saat ini semakin banyak dimanfaatkan untuk mendapatkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai inhibitor enzim, antivirus, antijamur, antimikroba, antiinflamasi, antitumor, dan sitotoksik telah ditemukan dan dikembangkan dari spons laut (2).

Spons laut merupakan hewan invertebrata dengan banyak pori kecil di permukaan tubuhnya. Spons memiliki kemampuan penyaringan makanan yang menyebabkan mikroorganisme dapat berada di dalam tubuh spons dan menjadi sumber makanannya. Mikroorganisme yang dapat tahan terhadap proses pencernaan dan respon imun spons akan tetap berada di dalam tubuh spons menjadi mikroba simbiosis kemudian akan mengalami adaptasi dan mekanisme simbiosis (3). Bakteri simbiosis mendapatkan keuntungan dari spons dengan mendapatkan tempat hidup serta nutrisi yang dibutuhkannya, sedangkan bakteri simbiosis dapat melakukan biosintesis di dalam tubuh spons sehingga dapat menghasilkan senyawa metabolit yang dibutuhkan spons (4). Seperti yang telah dilaporkan oleh Lee *et al* bahwa senyawa metabolit yang dimiliki oleh spons merupakan hasil biosintesis bakteri simbiosisnya, sehingga spons dapat mengandung komponen bioaktif yang sama dengan simbiosisnya.

Senyawa metabolit yang berpotensi sebagai antibakteri dapat diperoleh dari bakteri simbiosis spons dengan cara mengisolasi bakteri tersebut. Pengambilan senyawa bioaktif dari bakteri simbiosis spons dapat memberikan keuntungan dibandingkan dari spons karena mudah dibudidayakan dan dimanipulasi di bioreaktor (4). Hal itu seperti yang telah dilakukan oleh Mulyaningsih yaitu memanfaatkan bakteri simbiosis spons *Sphaciospongia inconstans* asal Pulau Harapan, Kepulauan Seribu untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri dengan melakukan isolasi terhadap bakteri simbiosis tersebut, lima isolat bakteri dengan kode 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4, dan 7FS5 yang telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri dan isolat bakteri kode 6FS3 menunjukkan aktivitas terbesar dengan potensi relatif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masing-masing sebesar $1,93 \times 10^{-3}$ dan $1,57 \times 10^{-3}$ kali kloramfenikol. Kelima isolat bakteri tersebut akan digunakan untuk pengembangan penelitian dengan dilakukan identifikasi secara molekuler, karena saat ini penelitian terhadap bakteri laut masih sangat terbatas bila dibandingkan dengan penelitian bakteri darat, selain itu isolat bakteri ini telah terbukti memiliki potensi sebagai penghasil antibakteri. Identifikasi secara molekuler dilakukan untuk mengetahui spesies dari isolat bakteri tersebut yang dapat dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (5).

Polymerase Chain Reaction adalah suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh sepasang primer. Primer merupakan suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA cetakan (6). Pasangan primer akan menempel pada DNA cetakan dan pada proses amplifikasi untaian DNA akan menjadi fragmen-fragmen DNA (amplikon) (7). Amplikon gen 16S rRNA adalah penanda molekuler yang paling banyak digunakan dalam analisa sekuensing untuk

tujuan penentuan spesies pada prokariota (8). Gen 16S rRNA adalah parameter yang cocok untuk klasifikasi bakteri karena universal di antara bakteri dan dilestarikan tetapi memiliki variasi yang cukup untuk membedakan antar taksa (9). Gen 16S rRNA berukuran sekitar 1550 pasang basa dan sekitar 500 basa di bagian ujung sekuens merupakan daerah yang disebut dengan hypervariable region, daerah ini merupakan bagian yang membedakan antar organisme (10).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang akan digunakan adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, erlenmeyer, mikroskop, gelas objek, *cover glass*, gelas ukur, *Beaker glass*, bunsen, LAF, cawan Petri, pipet mikro (Neson), tip, tabung mikrosentrifus, jarum Ose, batang pengaduk, kapas, kain kasa, plastik warp, inkubator (Mettler), autoklaf (Hiclave™HVE-50), oven, *hote plate*, *waterbath*, timbangan analitik, pemantik api, *microcentrifuge refrigerator*, *UV transilluminator* (ExtraGene), *PCR thermo cycler* (Tanach RAY-MG48), elektroforesis (Mupid EXU), vortex.

Bahan

Bahan peremajaan isolat bakteri simbion: lima isolat bakteri simbion *Sphaciospongia inconstans* yang telah terbukti memiliki potensi sebagai antibakteri hasil penelitian Mulyaningsih dengan kode 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4, dan 7FS5, *artificial seawater*, *Marine agar*. Bahan karakterisasi: Lima isolat bakteri *Speciospongia inconstans*, pewarna Gram, akuades. Bahan isolasi DNA genom: Lima isolat bakteri simbion spons *Sphaciospongia inconstans*, *Marine Broth*, isopropanol, etanol 70%, dan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) yang terdiri dari: *nuclei lysis solution*, *RNase solution*, *protein precipitation solution*, *DNA rehydration solution*, *lizozim*, *EDTA*. Bahan kima untuk PCR: *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'), *deionized demineralized water (ddH2O)*, dan *Go Taq Green*

PCR Master Mix 2x dari Promega, yang terdiri dari: *Taq DNA polymerase*, *PCR buffer*, dATP, dGTP, dTTP, dCTP, dan Mg²⁺. Bahan kimia untuk elektroforesis: Gel agarosa, etidium bromida, *buffer tris-asetat-EDTA (TAE)*, *DNA ladder*, dan *loading dye*.

TAHAPAN PENELITIAN

Peremajaan Isolat Bakteri Simbion Spons *Sphaciospongia inconstans*.

Peremajaan isolat bakteri dilakukan secara berkala dua bulan sekali (11). Lima isolat bakteri kode 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4, dan 7FS5 diinokulasi pada medium *Marine Agar slant* dengan komposisi medium yang terdiri dari: agar 15 g, FePO₄ 0,1 g, pepton 5 g, *yeast extract* 1 g, *artificial seawater* 1 l dengan cara mengambil koloni dari stok bakteri yang telah tersedia dengan menggunakan jarum Ose steril dan digoreskan pada media agar yang telah disterilkan dan diinkubasi pada suhu 37 oC selama 24 jam (12).

Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Simbion.

Karakterisasi morfologi isolat bakteri simbion spons *Sphaciospongia inconstans* dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis dilakukan terhadap bentuk koloni, tepian koloni, elevasi koloni, dan warna koloni (13). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram untuk melihat warna sel dan bentuk sel isolat bakteri simbion.

Isolasi DNA Genom.

Proses isolasi dilakukan berdasarkan pada protokol Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Isolat bakteri terlebih dahulu dikultur dalam medium *Marine Broth* 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. Supernatan yang

dihasilkan dari proses sentrifugasi dibuang sehingga hanya tersisa pelet sel bakteri. Pelet sel bakteri diresuspensi dalam 480 µl EDTA, kemudian ditambahkan enzim lisozim sebanyak 120 µl untuk melemahkan dinding sel bakteri 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 ditambahkan *nuclei lysis solution* sebanyak 600 µl, kemudian dihomogenkan dan inkubasi dengan suhu 80 °C selama 5 menit untuk melisiskan sel bakteri, selanjutnya dinginkan 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. Sampel diinkubasi dalam es selama 5 menit, kemudian 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 dilakukan 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. Pelet DNA kemudian ditambahkan DNA rehydration solution sebanyak 100 µl dan inkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam. Hasil DNA murni yang didapat disimpan segera pada suhu 2-8 °C.

Analisis DNA Genom dengan Elektroforesis

Proses analisis dilakukan dengan menggunakan agarosa konsentrasi 1%. Gel

agarosa yang telah dibuat dipindahkan ke wadah elektroforesis yang sebelumnya telah diberi *buffer* TAE 1x sampai menggenangi permukaan gel agarosa. Campuran DNA hasil isolasi sebanyak 10 µl dengan loading dye sebanyak 2 µl 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 dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Setelah proses tersebut selesai gel agarosa direndam dalam etidium bromida selama 15 menit dalam ruang gelap, lalu dibilas dengan akuades. Hasil diamati dengan menggunakan UV *transilluminator*, jika terlihat pita DNA menunjukkan hasil yang positif. Hasil yang didapat kemudian difoto untuk dokumentasi.

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 down dan dimasukkan ke dalam alat PCR.

Tahapan proses PCR menurut Fitriani (2016) terdiri terdiri dari: (a) *Initial denaturation* dilakukan sebanyak 1 siklus pada suhu 95 °C selama 5 menit. (b) Denaturasi dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 95 °C selama 1 menit. (c) *Annealing* dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 55 °C selama 1 menit. (d) Ekstensi dilakukan

sebanyak 30 siklus pada suhu 72 °C selama 1 menit. (e) Ekstensi akhir dilakukan sebanyak 1 siklus pada suhu 72 °C selama 10 menit.

Analisis Amplikon dengan Elektroforesis.

Analisis amplikon dilakukan dengan menggunakan gel agarosa konsentrasi 1%. Gel agarosa yang telah dibuat 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. Alat elektroforesis kemudian dinyalakan dan diatur dengan tegangan 50 volt selama 45 menit. Setelah proses tersebut selesai gel agarosa direndam dalam etidium bromida selama 15 menit dalam ruang gelap, lalu dibilas dengan akuades. Hasil diamati dengan menggunakan UV *transiluminator*, fragmen DNA yang muncul menunjukkan hasil yang positif. Hasil yang didapat kemudian difoto untuk dokumentasi.

Sekuensing Gen 16S rRNA.

Sampel dikirim ke 1st *Base Laboratories* di Malaysia untuk dilakukan purifikasi dan sekuensing. Analisis hasil sekuensing gen 16S rRNA dilakukan dengan program BioEdit. Hasil yang didapat dibandingkan dengan data yang terdapat pada *GenBank* dengan menggunakan

program *BLAST* (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Isolat Bakteri Spons Laut *Spheciospongia inconstans*.

Peremajaan isolat bakteri dilakukan pada medium Marine Agar slant yang dilakukan dua kali dalam satu bulan pada kelima isolat bakteri simbion yang telah berhasil diisolasi dari spons *Spheciospongia inconstans* oleh Mulyaningsih (2016) yang diberi kode 5FS1, 6FS2, 6FS3, 6FS4, dan 7FS5 (5).

Karakterisasi Morfologi Isolat Bakteri Simbion.

Hasil dari karakterisasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis kelima isolat bakteri simbion spons *Spheciospongia inconstans* dapat dilihat pada Tabel 1. Isolasi DNA Genom dan Analisis DNA Genom dengan Elektroforesis

Proses isolasi DNA isolat bakteri dilakukan dengan menggunakan protokol Wizard Genomic DNA Purification Kit untuk bakteri Gram positif. Hasil isolasi DNA genom dianalisis dengan

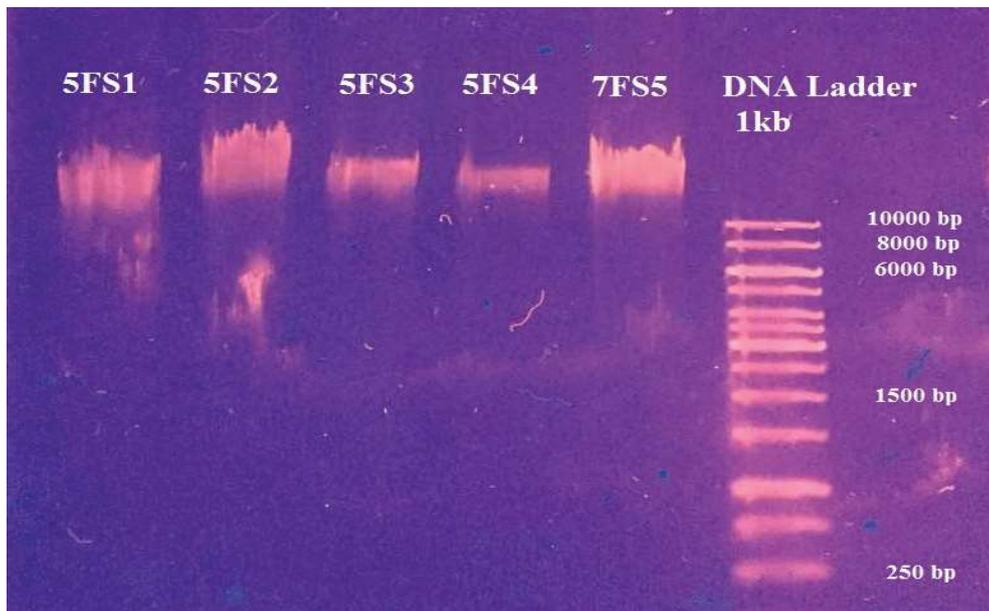
Tabel 1. Hasil Karakterisasi morfologi isolat bakteri simbion spons laut *Spheciospongia inconstans*.

| Morfologi | Kode Isolat | | | | |
|----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 5FS1 | 6FS2 | 6FS3 | 6FS4 | 7FS5 |
| Bentuk | Bundar dengan inti di tengah | Bundar | Bundar dengan inti di tengah | Bundar dengan tepian menyebar | Bundar dengan tepian menyebar |
| Warna | Orange | Kuning | Kuning | Putih | Putih |
| Elevansi | Cembung | Seperti tetesan | Seperti tetesan | Timbul | Berbukit-bukit |
| Tepian | Licin | Licin | Licin | Tidak beraturan | Berlekuk |
| Bentuk Sel | Basil | Basil | Basil | Basil | Basil |
| Pewarnaan Gram | Ungu | Ungu | Ungu | Ungu | Ungu |

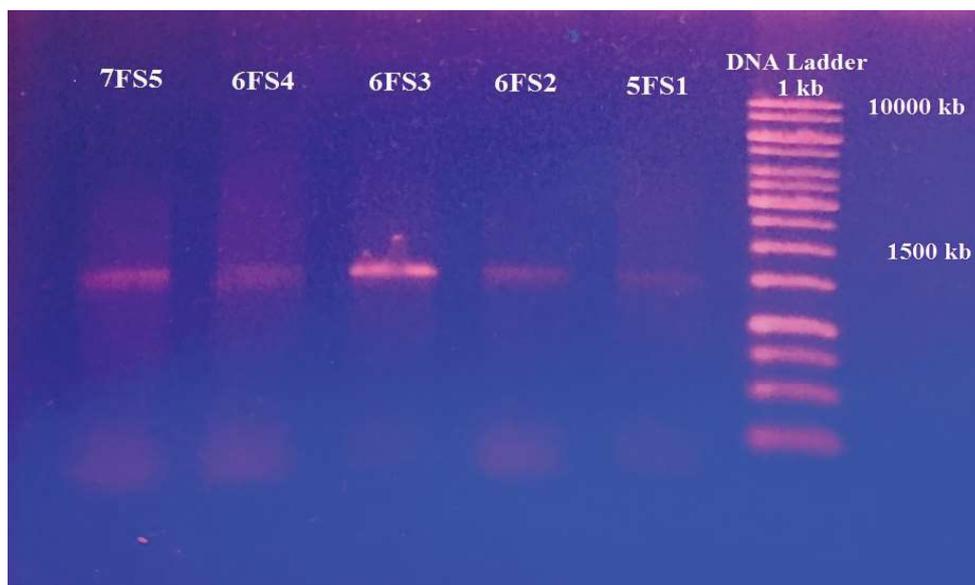
elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 1% dan menggunakan cairan buffer TAE 1X dengan tegangan 100 volt selama 45 menit. Hasil dari elektroforesis kelima DNA isolat bakteri menunjukkan terbentuknya pita DNA yang berukuran di atas 10.000 bp. Hasil tersebut menunjukkan pita DNA yang terlihat positif merupakan pita DNA genom bakteri karena pada umumnya DNA genom bakteri memiliki ukuran lebih dari 10000 bp (14). Hasil visualisasi hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 1.

Amplifikasi DNA dengan PCR dan Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis.

Proses amplifikasi dilakukan terhadap gen 16S rRNA dengan menggunakan primer 27f dan 1492r. Amplikon kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis dengan gel agarosa konsentrasi 1% dan tegangan 50 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis amplikon pada Gambar 2 menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan ukuran berada pada kisaran 1000-1500 bp. Hasil PCR yang dihasilkan memiliki ukuran yang



Gambar 1. Hasil Elektroforesis DNA Genom Isolat Bakteri Simbion *Sphaciospongia inconstans*



Gambar 2. Hasil elektroforesis amplikon isolat bakteri simbion *Sphaciospongia inconstans*

sesuai untuk ukuran gen 16S rRNA, seperti yang dikatakan oleh Clarridge (2004) bahwa gen 16S rRNA memiliki ukuran sekitar 1500 bp. Kelima sampel amplikon dikirim ke 1st BASE untuk dilakukan sekuensing.

Analisis Hasil Sekuensing.

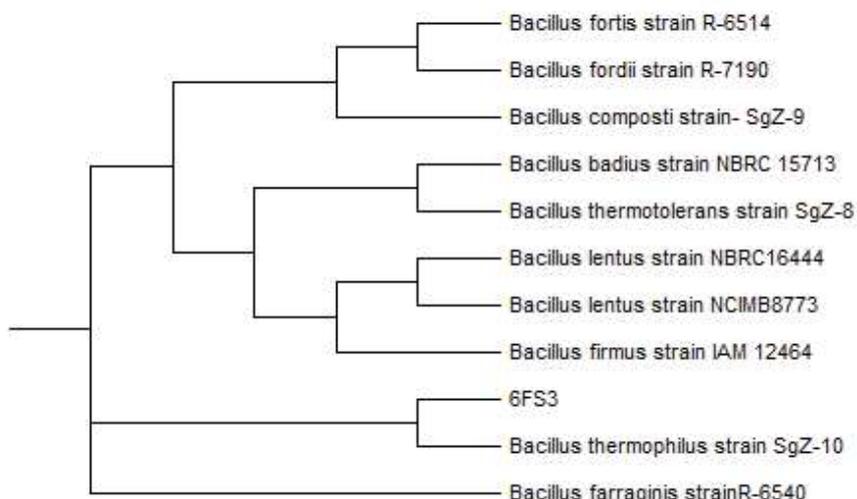
Sebelum dilakukan proses sekuensing, amplikon dari kelima isolat dilakukan verifikasi terlebih dahulu dengan dilakukan elektroforesis oleh 1st BASE. Hasil dari elektroforesis hanya sampel 5FS1, 6FS3, dan 6FS4 yang terlihat pita

DNA saat divisualisasi dengan ukuran 1500 bp, sehingga ketiga sampel tersebut yang akan diteruskan ke proses sekuensing. Hal tersebut dapat dikarenakan DNA hasil amplifikasi pada sampel isolat kode 6FS2 dan 7FS5 memiliki konsentrasi yang sangat rendah sehingga tidak dapat terdeteksi saat elektroforesis. Data hasil sekuensing dilakukan penyejajaran dengan data sekuens bakteri lain pada GenBank dengan menggunakan program BLAST NCBI (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Berdasarkan Gambar 3 diketahui isolat

| 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_109877.1 |
| Bacillus composti strain SgZ-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2460 | 2460 | 99% | 0.0 | 97% | NR_109878.1 |
| 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_025788.1 |
| Bacillus farraginis strain R-6540 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2335 | 2335 | 94% | 0.0 | 97% | NR_025785.1 |
| Bacillus badius strain NBRC 15713 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2294 | 2294 | 99% | 0.0 | 95% | NR_112833.1 |
| Bacillus lentus strain NBRC 16444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2289 | 2289 | 99% | 0.0 | 95% | NR_112831.1 |
| Bacillus lentus strain NCIMB8773 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 12464 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2281 | 2281 | 99% | 0.0 | 95% | NR_025842.1 |
| Bacillus gotthelii strain WCC 4585 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2279 | 2279 | 99% | 0.0 | 95% | NR_108491.1 |
| Bacillus firmus strain NBRC 15306 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2279 | 2279 | 99% | 0.0 | 95% | NR_112835.1 |

Gambar 3. Deskripsi hasil nucleotide BLAST Gen 16S rRNA Isolat bakteri simbion spons laut *Spheciospongia inconstans* kode 6FS3



Gambar 5. Pohon filogenetik Isolat bakteri simbion spons laut *Spheciospongia inconstans* kode 6FS3

bakteri simbiosis kode 6FS3 memiliki kemiripan dengan *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 sebesar 100%. Tahap selanjutnya dilakukan analisa filogenetik 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.

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 (Hatmanti 2000). *Bacillus thermophilus* strain Sgz-10 merupakan

bakteri yang termasuk ke dalam 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% (15).

KESIMPULAN.

Hasil dari penelitian ini adalah dari lima isolat bakteri simbiosis spons *Sphaciospongia inconstans* asal Pulau Harapan, Kepulauan Seribu yang telah diketahui memiliki potensi antibakteri, 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.

DAFTAR PUSTAKA

1. Priyanto. Farmakologi Dasar untuk Mahasiswa Farmasi dan Keperawatan. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi. Jakarta. 2010. Hlm. 83.
2. Mujiyanto, Amran RS. 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. 2012. Hlm. 593-606.
3. Lee YK, Lee JH, Lee HK. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Journal of Microbiology*. 2001;39(4): 254-264.
4. Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S. Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. *Marine Drugs*. 2010;8: 438-459.
5. Mulyaningsih F. Potensi Bakteri Simbiosis Spons Laut *Sphaciospongia inconstans* Asal Perairan Pulau Harapan, Kepulauan Seribu Sebagai Sumber Bahan Antibakteri. Skripsi. Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA. Jakarta. 2016. Hlm. 25.
6. Rahayu DA, Nugroho ED. Biologi Molekuler dalam Perspektif Konservasi. *Plantaxia*. Yogyakarta. 2015. Hlm. 40, 65, 80-81, 87-88, 100-101.
7. Aris M, Sukenda, Harris E, Sukandi MF, Yuhana M. Identifikasi Molekuler Bakteri Patogen dan Desain Primer PCR. *Budidaya Perairan*. 2013.;1(3): 43-50.
8. Pangastuti A. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16S rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Biodiversitas*. 2006; 7(3): 292-296.
9. Ntushelo K. Identifying Bacteria and Studying Bacterial Diversity Using The 16S Ribosomal RNA Gene-Based Sequencing Techniques: A Review. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; 7(49): 5533-5539.
10. Rinanda T. Analisis Sekuensing 16S rRNA di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 2011;11(3): 172-177.
11. Machmud M. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio*. 2001;4(1): 24-32.
12. Singkoh MFO. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Laut *Caulerpa racemosa* dari Perairan Pulau Nain. *Jurnal Perikanan dan Kelautan Tropis*. 2011;7(3): 123-127.

13. Safrida YD, Yulvizar C, Devira CN. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Berpotensi Probiotik pada Ikan Kembung. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir, dan Perikanan*. 2012;1(3): 200-203.
14. Pananjung AMS, Ulfa EU, Senjarini K, Arimurti S. Karakterisasi Isolat Bakteri Fibrinolitik Wu 021055* Asal Perairan Pantai Papuma, Jember. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 2015;2(1): 1-8.
15. Yang G, Chen M, Yu Z, Lu Q, Zhou S. *Bacillus composti* sp. nov. and *Bacillus thermophilus* sp. nov., Two Thermophilic, Fe (III)-Reducing Bacteria Isolated from Compost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63: 3030–3036.