

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Terumbu karang sebagai ekosistem hujan tropis di dasar laut karena termasuk salah satu ekosistem laut yang paling beragam dan merupakan salah satu keunikan bawa laut yang memiliki keindahan yang khusus di dunia. Hal ini dapat dilihat dari warna, bentuk serta keanekaragaman hidupnya. Ekosistem terumbu karang merupakan habitat untuk seluruh keanekaragaman biota laut di dunia yang saling berinteraksi antara satu dengan yang lainnya dengan lingkungan fisiknya (Soenardjo 2013). Bagi biota laut terumbu karang memiliki peran yang sangat penting yaitu sebagai tempat mencari makan (*feeding ground*), tempat memijah (*spawning ground*), dan tempat persembunyian. Dari segi ekologi terumbu karang memiliki peran sebagai pelindung pantai dari abrasi air laut, sedangkan dari segi ekonomi memiliki peran sebagai sumber mata pencaharian masyarakat pesisir.

Pulau Gili Labek merupakan salah satu pulau yang menyimpan potensi keanekaragaman terumbu karang yang cukup bagus. Dalam penelitian Abidin (2015) menjelaskan bahwa jenis-jenis terumbu karang di Pulau Gili Labek memiliki bentuk pertumbuhan (*Lifeform*) acropora dan non acropora pada kedalaman yang berbeda. Daerah Winward pada perairan dangkal dan perairan dalam terdiri dari karang acropora, karang non cropora, karang batu, dan fauna lainnya, Sedangkan untuk daerah Leeward pada perairan dangkal dan perairan dalam terdiri dari karang acropora, non acropora, karang batu dan fauna lainnya. Menurut Irawan (2016) menjelaskan bahwa Pulau Gili Labek akhir-akhir ini telah menjadi objek wisata favorit bagi para wisatawan, salah satunya adalah wisata terumbu karang. Kegiatan tersebut dapat menyebabkan kekeruhan dan kualitas perairan menjadi kurang baik sehingga akan mengganggu kehidupan terumbu karang di Pulau Gili Labek. Kegiatan pariwisata terumbu karang sangat berpotensi menimbulkan kerusakan terumbu karang dan pada akhirnya menimbulkan penyakit karang. Menurut Weil *et al* (2006) menjelaskan bahwa faktor utama yang memperburuk kondisi terumbu karang secara global karena terinfeksi oleh penyakit.

Jenis-jenis penyakit karang yang umum ditemukan dan masih terus dilakukan pengamatan yaitu penyakit *Black band disease*, *Darks spots disease*, *Read band disease*, *White band disease*, *White pox*, *Yello band disease*. Adanya penyakit karang dapat menimbulkan kekhawatiran karena penyakit-penyakit karang tergolong baru yang penyebarannya sangat cepat. Penyakit karang dapat menyerang ekologi karang yang tertata dengan baik karena penyerangannya hanya pada sebagian koloni kemudian menyebar hingga menulari koloni-koloni karang yang lain. Timbulnya penyakit karang karena adanya sinergisitas dari *triangel disease* yaitu hubungan antara lingkungan, hewan dan patogen (Sabdono 2008). Penyakit karang dapat disebabkan oleh mikroorganisme patogen salah satunya adalah bakteri (pamungkas *et al* 2014).

Menurut Insafitri melalui *personal communication* menjelaskan bahwa beberapa penyakit yang menyerang karang *Porites* sp di Pulau Gili Labek salah satunya adalah penyakit *white Plague*. Penyakit *White plague* di Pulau Gili Labek menyerang karang massive *Porites* sp. Kultur dan identifikasi molekular bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites* sp yang terinfeksi *White plague* telah ditemukan beberapa jenis bakteri yaitu *Bacillus firmus*, *Bacillus pseudomycoides*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans*. Menurut Irawan (2016) terumbu karang yang terinfeksi dicirikan dengan penyebaran area berwarna putih, bentuk dan ukurannya tidak teratur dan menyerupai bleaching. Namun bleaching jaringannya masih ada. Sedangkan pada penyakit *White plague* jaringannya sudah mati dan ditumbuhi alga. Sedangkan menurut Siringo-ringo terumbu karang yang terinfeksi penyakit *White plague* menunjukkan tingkat degradasi jaringan yang sangat cepat hingga 2 cm perhari. *White Plague* diakui sebagai penyakit perusak yang merusak karang bahkan menyebabkan kematian, sehingga dampaknya dapat menurunkan populasi karang.

Adanya berbagai patogenesis yang ditimbulkan oleh bakteri yang telah menginvasi sel inang menimbulkan pemikiran tentang suatu metode yang dapat menghambat maupun membunuh bakteri patogen tersebut salah satunya menggunakan metode antibakteri dengan tujuan untuk mencegah atau mengobati penyakit karang yang terserang penyakit *White plague*. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Porites attenuata* yang masih dalam kondisi sehat.

Karang *Porites attenuata* diindikasikan memiliki kandungan senyawa antibakteri yang dapat mencegah atau mengobati penyakit karang yang terserang White plague di Pulau Gili Labek. Selain itu Penelitian mengenai identifikasi molekuler bakteri *Porites attenuata* sebagai antibakteri di Pulau Gili Labek masih jarang dan baru di lakukan. Sehingga diperlukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri yang berasosiasi pada karang sehat.

Identifikasi sulit dilakukan hanya dengan menggunakan data morfologi, karena variasi warna pada bakteri dapat berbeda baik antar spesies maupun antar jenis kelamin yang berbeda dalam satu spesies yang sama. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode lain untuk mendukung dan memvalidasi data morfologi. Filogenetik merupakan salah tau metode yang menggunakan data genetik untuk identifikasi organisme, sehingga metode ini diharapkan dapat membantu identifikasi spesies bakteri dilihat dari variasi genetiknya (Pertiwi 2015). Selain untuk identifikasi metode ini juga dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies serta evolusi yang terjadi (Thacker 2003).

I.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* penghasil antibakteri dalam upaya pengendalian penyakit *White Plague* pada karang *Porites* sp di Pulau Gili Labek
2. Apa jenis bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* penghasil antibakteri dalam upaya pengendalian penyakit *White Plague* pada karang *Porites* sp di Pulau Gili Labek.

1.5 Batasan masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian ini menggunakan sampel penyakit *White plague*
2. Sampel karang yang dianalisa adalah *Porites attenuata*
3. Bakteri yang memiliki antibakteri
4. Identifikasi bakteri berdasarkan 16s rDNA

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui aktivitas bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* penghasil antibakteri dalam upaya pengendalian penyakit white plague pada karang *Porites* sp di Pulau Gili Labek
2. Untuk mengetahui jenis bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* penghasil antibakteri dalam upaya pengendalian penyakit *White plague* pada karang *Porites attenuata*

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini untuk memberikan informasi mengenai jenis bakteri karang sehat *Porites attenuata* yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang menghambat penyakit porites white plague (PWP) di perairan Pulau Gili Labek

II. TINJAUAN PUSTAKA

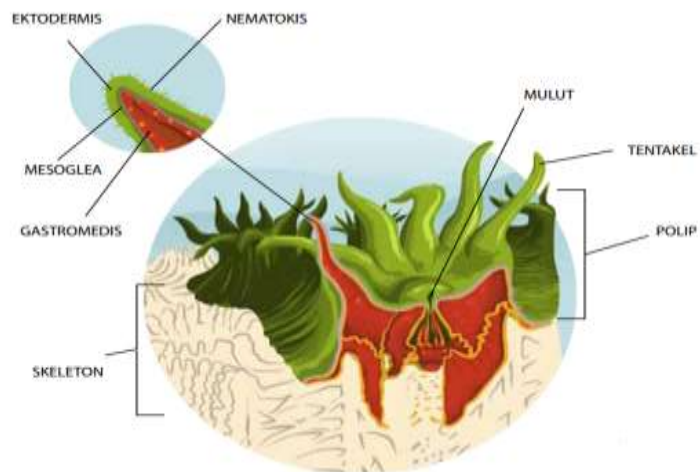
2.1 Biologi Karang

2.1.1 Anatomi Karang

Terumbu karang merupakan ekosistem yang dibangun oleh biota laut penghasil kapur, terutama oleh hewan karang, bersama-sama dengan biota yang lain yang hidup di dasar laut maupun kolam air. (Giyanto *et al* 2017). Karang merupakan hewan sederhana yang berbentuk seperti tabung dengan memiliki mulut yang berada diatas dan mulutnya dan juga berfungsi sebagai anus, memiliki tentakel disekitar mulutnya yang berfungsi untuk menangkap makanan,, memiliki tenggorokan pendek yang terhubung langsung dengan rongga perut, terdapat mesenterii filamen yang memiliki fungsi sebagai alat pencernaan. Polip Didukung oleh kerangka kapur sebagai penyangga sehingga seluruh jaringan dari karang dapat berdiri tegak (Suharsono 2008).

Hewan karang yang merupakan penyusun terumbu karang terdiri dari polip dan skeleton. Polip merupakan bagian yang lunak sedangkan skeleton merupakan bagian yang keras. Pada bagian polip terdapat tangan-tangan (tentakel). Setiap polip mengekskresikan zat kapur CaCO_3 yang membentuk kerangka skeleton karang. Dinding polip terdiri dari ektodermis, nematosis, mesoglea, gastrodermis (Gambar 2.1). Dalam proses pembentukan terumbu karang terjadi hubungan saling menguntungkan antara polip karang dan zooxanthellae. Ketika terkena sinar matahari zooxanthellae menghasilkan oksigen dan nutrisi yang terdiri dari glycerol, glukosa dan asam amino yang melekat dilapisan luar polip karang. Sedangkan polip karang memberikan tempat hidup dan juga CO_2 yang dapat digunakan zooxanthellae untuk berfotosintesis (Dahuri 2003).

Beberapa jenis karang memiliki polip yang terlihat jelas (kanan) dan ada pula beberapa jenis karang yang polipnya kurang jelas (kiri) (Gambar 2.2). Secara umum karang hidup membentuk koloni yang dibentuk ribuan polip yang tumbuh dan menjadi satu koloni. Namun adapula sebagian dari karang yang hidupnya soliter dan tidak membentuk koloni misalnya pada beberapa karang dari famili fungidae (Gambar 2.3) (Giyanto *et al* 2017).



Gambar 2.1 Polip dan skeleton karang (Giyanto *et al* 2017)



Gambar 2.2 Polip pada karang yang terlihat jelas (kiri) dan polip karang yang kurang terlihat (kanan) (Giyanto *et al* 2017)



Gambar 2.3 Karang yang hidup soliter dan tidak membentuk koloni (Giyanto *et al* 2017)

2.1.2 Reproduksi Karang

Reproduksi adalah salah satu fenomena biologi dalam awal siklus suatu organisme. Menurut Wood (1983) menjelaskan bahwa reproduksi mengarah kepada kelangsungan hidup di muka bumi sehingga suatu spesies dapat mempertahankan keberadaannya secara terus menerus, yaitu dengan menghasilkan suatu organisme baru. Reproduksi dapat diartikan apabila suatu organisme menghasilkan keturunan dan mewariskan kandungan genetik mereka dalam bentuk kode-kode genetik yang ditujukan untuk pembangunan karakter umum mereka, baik karakter morfologi, fisiologi atau karakter khusus yang membedakan mereka sebagai individu. Hewan karang melakukan dua reproduksi yaitu reproduksi seksual dan aseksual.

a. Reproduksi Seksual.

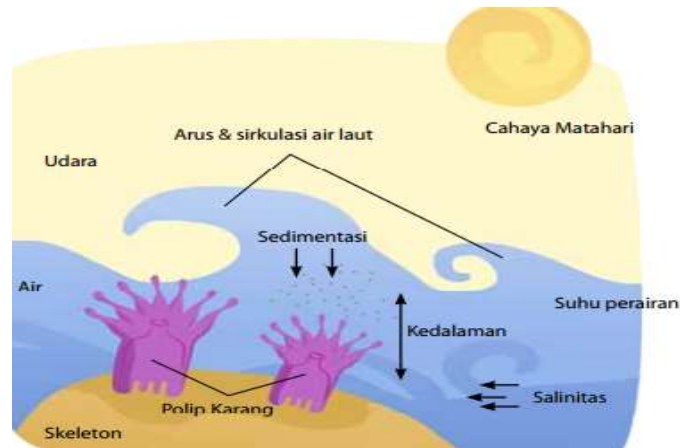
Secara seksual, pembuahan dan perkembangan secara internal maupun eksternal dapat dijumpai pada hewan karang (Veron 2000). Pemijahan pada karang terjadi pada malam ketiga hingga keenam setelah bulan purnama, khususnya pada rentang terendah antara pasang dan surut. Larva planula yang dihasilkan biasanya melekat pada dasar perairan setelah 4-10 hari. Sebagian besar larva planula melekat langsung di atas terumbu atau di dalam jarak sekitar 600 m dari asalnya. Polip karang secara aseksual memperbanyak diri dengan pertunasan intratentakel dan ekstatentakel, pertunasan ini untuk menambah ukuran koloni (Gzimerk, 1976).

b. Reproduksi aseksual

Reproduksi secara seksual biasanya atau pada umumnya dengan pembentukan tunas (Nybakken 1988). Selanjutnya dikatakan oleh Gzimerk (1976) bahwa hasil dari budding (pertunasan) ini akan menghasilkan pertumbuhan yang placoid, cerioid, meandroid, atau flabello meandroid.

2.2 Faktor Pembatas Terumbu Karang

Kelestarian terumbu karang akan tetap terjaga apabila kondisi lingkungan tetap mendukung keberadaannya dari berbagai macam ancaman. Menurut Giyanto *et al* (2017) menjelaskan bahwa sebaran terumbu karang tidak merata oleh karena adanya faktor pembatas dari terumbu karang tersebut. Faktor pembatas terumbu karang dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Faktor pembatas terumbu karang (Giyanto *et al* 2017)

Kelestarian terumbu karang akan tetap terjaga apabila kondisi lingkungan tetap mendukung keberadaannya dari berbagai ancaman. Terumbu karang sangat peka terhadap kondisi lingkungan perairan.

1. Kedalaman

Kebanyakan dari terumbu karang dapat hidup pada kedalaman 0-25 m dari permukaan air laut. Terumbu karang tidak dapat hidup dan berkembang pada perairan dalam yaitu antar 50-70 m. Hal inilah yang menerangkan mengapa struktur terumbu terbatas hingga pinggiran benua-benua atau pulau-pulau. Namun secara umum karang tumbuh baik pada kedalaman kurang dari 20 m (Kisman 1964).

2. Suhu Perairan

Terumbu karang bisa hidup pada suhu perairan diatas 180°C. Suhu ideal untuk pertumbuhan trumbu karang berkisar 27-29°C. Kenaikan suhu air laut diatas suhu normalnya akan menyebabkan pemutihan karang global (coral bleaching) sehingga karang akan berubah warna menjadi putih. Bila hal tersebut berlanjut hingga beberapa minggu, akan menyebabkan kematian. Adanya pengaruh suhu untuk pertumbuhan karang menyebabkan penyebaran karang hanya ada di daerah tropis dan subtopis. yaitu pada sekitar 30° LU - 30° LS (Giyanto *et al* 2017).

3. Cahaya matahari

Karang yang hidup bersimbiosis dengan zooxanthellae yang hidup didalam jaringan karang sehingg memerlukan cahha matahari yang digunakan

untuk proses fotosintesis. Oleh karena itu terumbu karang sulit hidup pada perairan dalam yang penetrasi cahayanya sangat kurang, biasanya pada kedalaman lebih dari 50 m (Giyanto *et al* 2017).

4. Salinitas

Terumbu karang dapat hidup pada salinitas berkisar antara 30-36‰. Terumbu karang tidak dapat hidup pada salinitas rendah seperti air tawar. Oleh karena itu karang tidak dijumpai di sungai ataupun muara sungai yang memiliki salinitas yang rendah (Giyanto *et al* 2017)

5. Sedimentasi

Pengendapan (sedimentasi) juga berpengaruh terhadap pertumbuhan terumbu karang, dimana pengendapan yang terjadi di dalam air atau diatas karang memiliki pengaruh negatif terhadap karang. Endapan yang terjadi dapat mengurangi cahaya yang dibutuhkan oleh zooxanthellae dalam jaringan karang. Akibatnya, pengembangan terumbu karang yang pengendapannya lebih besar akan berkurang atau menghilang (Nybakken 1988). Giyanto *et al* (2017) menjelaskan bahwa butiran sedimen dapat menutupi polip karang, dan bila berlangsung lama dapat menyebabkan kematian karang. Oleh karena itu terumbu karang tidak dijumpai pada perairan yang sedimentasinya tinggi.

6. Substrat

Larva karang disebut planula memerlukan substrat yang keras dan stabil yang digunakan untuk menempel hingga tumbuh menjadi karang dewasa. Substrat yang labil, seperti pasir akan sulit bagi planula untuk menempel (Giyanto *et al* 2017).

2.3 *Porites attenuata*

Karang genus *porites* merupakan karang yang tergolong dalam karang massive, koloni karang mempunyai bentuk pertumbuhan massive, encrusting, bercabang berbentuk lembaran serta memiliki korali yang kecil cereoid. Septanya saling bersatu dan membentuk struktur yang khas yang dipakai untuk identifikasi jenis. Ciri khas antara lain adanya tiga septa yang bercabang menjadi satu yang disebut triplet dengan satu pali. Genus *Porites* mempunyai sekitar 25 jenis yang tersebar di perairan Indonesia (Suharsono 2008).

Koloni karang spesies *Porites attenuata* mempunyai bentuk pertumbuhan yang bercabang dengan ujung koralit yang bulat dan coenosteum kasar. Biasanya berwarna hijau kekuningan (cerah), dan juga coklat pucat (Gambar 2.5). Jenis yang serupa dengan *Porites attenuata* yaitu *Porites cylindrica*, yang memiliki cabang lebih halus. Habitat dari karang ini yaitu hidup pada lingkungan perairan yang dangkal. Umumnya sampai kedalaman 20 meter (Veron 2000). Spesies ini tersebar luas dan umum umum jangkauannya salah satunya di perairan Indonesia. Namun, sangat rentan terhadap pemutihan penyakit dan permanen untuk perdangan akuarium, dan pengurangan habitat terumbu karang yang luas karena kombinasi ancaman (Sheppard *et al* 2008). Klasifikasi *Porites attenuata* menurut Sheppard *et al*(2008).

Kingdom: Animalia

Philum : Cnidaria

Class: Anthozoa

Ordo: Scleractinia

Famili : Poritidae

Genus: *Porites*

Spesies : *Porites attenuata*



Gambar 2.5 *Porites attenuata* (Veron 2000)

2.4 Penyakit Karang White Plague

Menurut Sabdono (2008) Secara garis besar penyakit dapat didefinisikan sebagai proses pathologi yang disebabkan oleh kejadian iritasi terus menerus. Biasanya perubahan fisiologi abnormal yang disebabkan oleh agen non-parasit

dinamakan *disorder*. Sedangkan pathogen adalah agen yang menyebabkan penyakit, yang biasanya istilah ini digunakan oleh organisme hidup, misalnya jamur dan parasit (Sadono 2008). Penyakit karang diartikan sebagai semua perusakan suatu sistem atau fungsi penting organisme, mencakup gangguan (*interruption*), perhentian (*cessation*), perkembangan biakan (*proliferation*) atau kegagalan lain (*other malfunction*). (Siringoringo 2007). Penyakit karang (*coral disease*) tidak hanya disebabkan oleh mikroorganisme, namun masih banyak penyebab lainnya. Berdasarkan penyebabnya penyakit karang dapat digolongkan menjadi dua, yaitu infeksi pathogen dan noninfeksi. Pathogen dibedakan menjadi dua yaitu mikro parasit dan makro parasit. Sedangkan noninfeksi dapat berupa, kekurangan nutrisi, mutasi genetik, meningkatnya suhu air laut, radiasi ultraviolet, sedimentasi dan polutan (Santavy dan Peters 1997 dalam Siringoringo 2007).

Penyakit karang dapat timbul karena adanya sinergisitas dari *triangel disease* yaitu hubungan antara patogen, lingkungan, dan hewan karang. (Sabdon 2008 dalam Pamungkas *et al* 2014). Beberapa kasus penyakit karang yang terjadi disebabkan serangan patogen, kondisi lingkungan yang menyebabkan karang tersebut terinfeksi penyakit karang, dan kondisi karang yang sedang lemah (Pamungkas *et al* 2014). Adanya penyakit karang menimbulkan kekhawatiran terhadap kelestarian terumbu karang karena penyakit karang penyebarannya sangat cepat dan akan merusak sistem ekologi karang dan akan menyebar hingga menuliri koloni lain. (Pamungkas *et al* 2014).

Penyakit *White plague* (WP) dapat dilihat pada Gambar 2.6 merupakan penyakit yang sering menyerang terumbu karang. *White Plague* diakui sebagai penyakit perusak yang merusak karang bahkan menyebabkan kematian (Zvuloni *et al* 2015). Penyakit *White plague* (WP) terlihat mirip dengan *White band disease* (WBD), tetapi *White plague* (WP) menyerang pada karang yang berbeda. *White plague* (WP) sering menyerang karang jenis *massive* dan *encrusting* (Siringoringo 2007). Penyakit *White Plague* ditandai dengan adanya suatu garis kasar atau *band* putih, yang memisahkan jaringan hidup dari *skeleton* yang telah dikolonisasi alga dan juga sering nampak satu pita sempit dan jaringan mati yang bersebelahan dengan *skeleton*. Biasanya dimulai dari dasar koloni, lalu menyebar dengan cepat ke arah atas dan ke arah luar (Sabdon 2008). Zvuloni *et al* (2008)

menjelaskan bahwa Penyakit white plague yang menyerang terumbu karang di laut Karibia disebabkan oleh bakteri patogen *Aurantimonas coralicida* sedangkan di laut merah disebabkan oleh bakteri *Aurantimonas loyana*.



Gambar 2.6 Penyakit White Plague pada karang (Raymundo dan Harvell 2008)

2.5 Bakteri Laut

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan ukuran panjang 0,5-10 μ dan lebar 0,5-2,5 μ . Karakteristik bakteri dilihat dari bentuknya seperti cocci (bulat), spirilli (batang), koma (vibrios). Tambahan struktur bakteri yang terpenting diketahui cambuk (flagella), kapsul (capsule) dan endospora (endospore). Flagella merupakan struktur tambahan di luar sel yang berbentuk cabuk halus yang tidak terlihat dibawah mikroskop kecuali menggunakan pewarnaan khusus. Susunan flagella pada sel dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu flagella peitrichous dan flagella polar (Arisandi 2017).

Mikroorganisme laut mampu mendiami seluruh bagaian laut, mulai dari permukaan air laut hingga dasar laut yang paling dalam. Beberapa jenis bakteri darat dan air tawar dapat bertahan hidup dalam larutan garam, keadaan ini membuat bakteri darat dan air tawar akan ditemukan hidup bersama-sama secara bebas dengan bakteri laut. Sebagian besar bakteri laut bergerak secara aktif yang diperkirakan kemampuan bergerak sebagai hasil adaptasi kehidupan perairan (Zobell 1946).

Bakteri laut memiliki kecenderungan untuk berasosiasi dengan suatu lapisan permukaan padat. Bakteri yang hidup di laut dengan nutrien yang amat encer, amat tergantung pada pada substrat yang dilekatinya. Dengan demikian

sangatlah wajar sebagian besar bakteri laut menjadi teradaptasi kehidupan sesil, terutama akibat rendahnya kandungan nutrisi dalam air laut (Siharta 2000).

2.6 Faktor yang mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut:

a. Media pembiakan/Nutrisi

Bakteri membutuhkan media yang baik untuk mendukung pertumbuhannya. Media yang tepat akan menghasilkan bakteri yang sesuai dengan standar pengujian. Media pembiakan dasar adalah media pembiakan sederhana yang mengandung zat-zat yang umum diperlukan sebagian besar mikroorganisme untuk tumbuh. Kebutuhan bakteri pada umumnya adalah terpenuhinya karbon, nitrogen, sumber garam-garam anorganik, fosfat dan sulfat sebagai anion, potasium, sodium, magnesium, kalsium, besi, dan mangan sebagai kation (Astutiningrum 2016)

b. Temperatur

Salah satu parameter fisik yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah temperatur. Setiap mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada temperatur dengan rentang tertentu. Berdasarkan temperatur, bakteri dapat dibedakan menjadi tiga golongan yaitu bakteri termofilik dapat tumbuh pada temperatur 40°-80°C, mesofilik yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada temperatur 10°-45°C, dan bakteri psikofilik yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada temperatur 0°-35°C. Banyak reaksi kimia di dalam metabolisme bakteri yang dipengaruhi oleh panas, semakin tinggi temperatur maka semakin tinggi reaksi kimia yang terjadi. Namun akan terjadi saat dimana temperatur dapat merubah struktur enzim sehingga menyebabkan turunnya aktivitas bakteri. Temperatur ini disebut temperatur maksimum dimana bakteri dapat hidup dan beraktivitas (Sarhini 2012).

c. pH

pH mempengaruhi kemampuan mikroorganisme untuk mengadakan transpor membran sel dan keseimbangan dari reaksi katalisis. Kebanyakan bakteri tumbuh subur pH netral. Pada pH 5 atau kurang dari itu, pertumbuhan bakteri sangat lambat. Pada umumnya pH harus mendekati 7 dengan rentang pH 4-10 agar bakteri dapat tumbuh. Untuk oksidasi nitrogen dan fermentasi metana,

rentang pH terbatas 6-8. Degradasi hidrokarbon menjadi lebih cepat pada pH diatas 7. Mempertahankan nilai pH tertentu sepanjang pertumbuhan, mempunyai arti penting bagi mikroorganisme. Ada bakteri yang tidak tahan terhadap asam tetapi menghasilkan asam metabolismenya, seperti *Lactobacillus*, *Enterobacteriace*, dan *pseudomonas*. Hal ini dapat menyebabkan terhentinya pertumbuhan dan menyebabkan kematian. Untuk menghindari kematian bakteri akibat asam dapat digunakan substrat yang dapat diragikan atau mendapatkan media baik. Fosfat anorganik dapat mengembangkan efek dari pH tertentu diatas pH 7,2. Kalsium karbonat atau natrium bikarbonat juga dapat ditambahkan untuk menaikkan pH (Sarbini 2012).

d. Oksigen

Bakteri aerob memerlukan oksigen untuk dua tujuan, tujuan yang paling utama adalah sebagai sumber akseptor elektron untuk sistem transport elektron. Sedangkan tujuan yang lain adalah untuk reaksi enzim tertentu. Oksidasi dari hidrokarbon membutuhkan oksigen. Bakteri yang hidup tanpa oksigen tidak dapat mendegradasi hidrokarbon (Dina Kuswardini dalam Sarbini 2102).

2.7 Pengertian Aktivitas Antibakteri

Antibiotika adalah senyawa organisme yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup termasuk turunan senyawa dan struktur yang dibuat secara sintetik dan dalam kedaan kadar yang rendah yang mampu menghasilkan proses penting dalam kehidupan mikroorganisme. Antibiotika bisa didapatkan dari tumbuhan tingkat tinggi dan hewan. Salah satu contoh antibiotika adalah antibakteri. Antibakteri adalah hewan yang menekan atau membunuh reproduksi bakteri. Suatu zat antibakteri yang ideal harus mempunyai sifat toksisitas selektif dalam artian berbahaya terhadap parasit tetapi tidak akan membahayakan tuan rumah (hopses) (Soekardjo dan Siswandono 2000).

Zat antibakteri dibagi menjadi dua kelompok yaitu bakteristatik artinya dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakteriosidal dapat yang artinya dapat membunuh pertumbuhan bakteri patogen. Berdasarkan daya hambat atau membunuhnya, antibakteri dibagi menjadi dua kelompok, yaitu berspektrum sempit (narrow spectrum) dan berspektrum luas (broad spectrum). Antibakteri

yang berspektrum sempit yaitu antibakteri yang hanya dapat bekerja baik pada bakteri tertentu saja, misalnya hanya terdapat pada bakteri gram negatif atau positif saja. Antibakteri yang berspektrum luas dapat bekerja baik pada bakteri gram negatif maupun gram positif (Talaro 2008).

Ciri-ciri antibakteri yang baik menurut Pelczar dan Chan (2005) adalah :

1. mampu membunuh ataupun menghambat pertumbuhan bakteri
2. substansi itu harus dapat larut dalam air atau pelarut-pelarut lain sampai pada taraf yang diperlukan
3. perubahan yang terjadi pada substansi itu bila dibiarkan beberapa lama harus seminimal mungkin dan tidak boleh mengakibatkan kehilangan sifat antimikrobiahnya dengan nyata.
4. tidak bersifat racun pada bagi manusia maupun hewan lain
5. Komposisinya harus seragam sehingga bahan aktifnya selalu terdapat pada setiap aplikasi.
6. tidak bergabung dengan bahan organik, banyak disinfektan bergabung dengan protein atau bahan organik lain apabila disinfektan semacam itu digunakan di dalam keadaan yang banyak mengandung bahan organik, maka sebagian besar dari disinfektan itu akan menjadi aktif
7. aktivitas antimikrobiah pada suhu kamar atau pada suhu tubuh.
8. kemampuan untuk menembus
9. tidak menimbulkan karat warna
10. memiliki kemampuan menghilangkan bau yang kurang sedap
11. berkemampuan sebagai deterjen. suatu disinfektan yang juga merupakan deterjen mempunyai keuntungan bahwa efeknya sebagai pembersih memperbaiki keefektifannya sebagai disinfektan

2.8 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA adalah suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh DNA murni tanpa bahan penotor yang berupa protein maupun RNA. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan beberapa pelarut ataupun nitrogen cair untuk melisis jaringan (Dwiyatno 2008). Hasil ekstraksi akan digunakan sebagai DNA cetakan yang nantinya akan diperbanyak dengan metode PCR. Pada ekstraksi DNA

ditambahkan larutan buffer dalam jumlah sedikit yang berfungsi sebagai deterjen untuk melepaskan atau mengikat DNA. Deterjen juga menghambat aktivitas nuklease pada saat preparasi. Protein didegradasi menggunakan enzim proteolitik yang dicampur lalu dikocok dengan fenol atau kloroform (Karp 1984 *dalam* Kurnia 2010). Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan metode CTAB maupun dengan kit komersial yaitu Vivantis. Proses ekstraksi DNA untuk melisis sel dan kemudian mendegradasi protein dan melarutkan komponen selular lain sehingga akan diperoleh DNA. Perusahaan yang memproduksi kit menyediakan larutan yang dapat langsung digunakan dan ditambahkan dalam proses ekstraksi DNA proses ekstraksi DNA (Baker 2000 *dalam* Kurnia 2010).

DNA genom yang dapat diekstraksi dengan berbagai cara. Pada prinsipnya, sel harus dipecah terlebih dahulu menggunakan beberapa cara, baik fisik maupun kimiawi, termasuk penggunaan enzim tertentu. Pemecahan sel secara fisik dapat dilakukan misalnya dengan alat sonikator yaitu dengan menggunakan frekuensi ultratinggi (Yuwono 2006 *dalam* Kurnia 2010). Pemecahan sel juga dapat dilakukan dengan menggunakan enzim lisozim yang dapat memecah dinding sel. Senyawa lain yang sering digunakan untuk memecah sel untuk ekstraksi DNA genom adalah CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida*) selain itu juga dapat menggunakan kit komersial (Muladno 2002 *dalam* kurnia 2010).

Metode umum yang digunakan untuk ekstraksi jaringan hewan menggunakan proteinase K dan sodium dodesil sulfat untuk mendegradasi protein erta fenol atau kloroform untuk melarutkan komponen seluler dan penambahan alkohol untuk presipitasi DNA. Metode CTAB juga umum digunakan baik dalam proses ekstraksi DNA tanaman maupun ekstraksi DNA hewan. Metode ekstraksi DNA tanaman memerlukan penggerusan sebab tanaman memiliki dinding sel sedangkan pada ekstraksi DNA hewan tidak perlu dilakukan penggerusan namun umumnya baik ekstraksi DNA tanaman maupun hewan dilakukan penggerusan terlebih dahulu untuk memastikan jaringan mengalami lisis. Proses ekstraksi DNA dapat dilakukan lebih cepat dengan menggunakan kit komersial dan hanya memerlukan beberapa langkah untuk melakukan ekstraksi DNA (Less 2003 *dalam* kurnia 2010).

Beberapa metode yang digunakan untuk ekstraksi DNA terutama pada laboratorium forensik diantaranya adalah metode fenol kloroform, metode chelex dan metode FTA (Flitzco/Flinder Technology Agreement). Prosedur dari tiap metode bervariasi tergantung dari mana sumber DNA yang diekstraksi. Misalnya sampel darah dapat diperlakukan berbeda dengan sampel noda darah atau sampel tulang. Metode chelex sering dijadikan alternatif ekstraksi dan juga tidak mahal. Metode chelex ini menggunakan suspensi resin pengikat ion yang langsung dicampur kedalam sampel. Suspensi resin pada chelex merupakan larutan difinilbenzena yang mengandung ion imino diasetat yang dapat mengikat ion-ion metal seperti magnesium dengan mengikat magnesium, enzim penghasncur DNA akan tidak aktif sehingga molekul DNA akan tetap terlindungi. Hasil yang didapat dari metode ini yaitu DNA single strand sehingga perlu dilanjutkan analisa PCR. Metode ini sangat baik digunakan untuk analisis PCR karena dapat menghilangkan inhibitor PCR serta hanya memerlukan satu mikrotube sehingga kemungkinan adanya kontaminasi sangat kecil, selain itu, metode chelex tidak memerlukan sampel dalam jumlah besar dan langkah kerja yang banyak dibandingkan dengan metode organik (Butler dan Hill 2012).

2.9 Amplifikasi DNA (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) merupakan salah satu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan ditemukannya teknik PCR disamping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekuler (Handoyo *et al* 2001).

Amplifikasi DNA PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA. PCR memungkinkan dilakukannya pelipat gandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA template

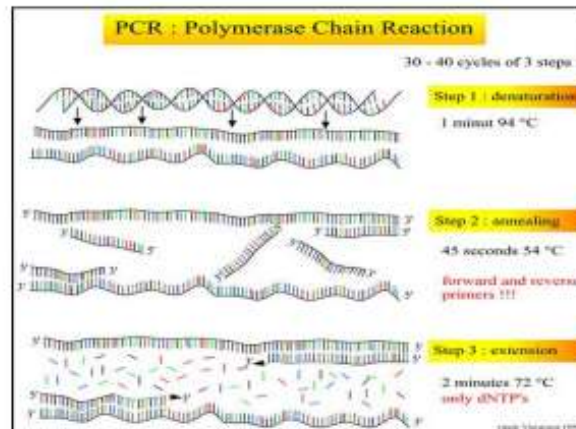
(cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil taq dari bakteri termofilik *thermus aquatiquus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium mentimulasi aktivasi polimerase (Yusuf 2010).

Yusuf (201) menjelaskan bahwa pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama yaitu :

- a. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 105-106 molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
- b. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (18-28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA dan mempunyai kandungan G+C sebesar 50-60%
- c. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yaitu terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP. dNTP mengikat ion Mg^{2+} sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Inilah yang diperlukan untuk reaksi polimerasi
- d. Enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh dari Eubacterium yang disebut *Thermus aquatiquus*, spesies ini diisolasi dari tanaman yellowstone pada tahun 1969. Enzim polimerase taq tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
- e. Komponen pendukung adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung 10 – 50 mM Tris-HCl pH 8,3-8,8 (suhu 20°C); 50 mM KCl; 0,1% gelatin atau BSA (Bovine Serum Albumin); 0,1%; disamping itu perlu ditambahkan 1,5 mM $MgCl_2$.

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi (pemanasan) DNA sehingga mengakibatkan rantai DNA yang berantai ganda (double stranded) akan terpisah menjadi rantai tunggal (single stranded). Denaturasi DNA dilakukan mengunkan pada suhu 95°C selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C, pada suhu ini primer akan menempel

(annealing) pada cetakan yang terpisah menjadi rantai tunggal. Proses denaturasi terjadi secara cepat pada suhu 94°C - 96°C . Penempelan primer tergantung pada suhu melting (T_m). Secara umum, program software komputer dapat digunakan untuk memprediksi T_m berdasarkan urutan primer. Penempelan yang paling baik ditentukan oleh optimasi. Proses pemanjangan secara umum terjadi pada suhu 72°C (Gambar 2.7) (Kurnia 2010).



Gambar 2.7 Siklus PCR (Kurnia 2010)

2.10 Elektroforesis

Elektroforesis adalah teknik molekul bermuatan berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi dalam medan listrik. Prinsip kerja elektroforesis ditujukan terhadap pemisah molekul-molekul organik seperti DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukuran ataupun muatan. Teknik elektroforesis menggunakan matriks gel yang berfungsi sebagai medan listrik tempat terjadinya migrasi dari molekul-molekul organik (Annisa 2012).

DNA yang telah dimasukkan ke dalam akan bermigrasi. Suatu gel merupakan jaring-jaring kompleks. Molekul bermuatan negatif (anion) akan bermigrasi ke elektroda positif (katoda). Molekul-molekul DNA bergerak melalui gel dengan kecepatan yang berbeda tergantung ukurannya. Gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen-fragmen DNA yang ukurannya mulai dari ratusan sampai sekitar 20.000 pasangan basa sedangkan poliakrilamida untuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil. Elektroforesis merupakan salah satu cara yang

digunakan untuk memvisualisasikan hasil PCR berupa fragmen-fragmen DNA yang telah diamplifikasi. Visualisasi fragmen DNA atau RNA dapat dilihat dengan pewarnaan menggunakan etidium bromida (EtBr) sebagai agen interkalase yang dapat meningkatkan daya fluoresensi DNA dibawah sinar ultraviolet (UV) (Annisa 2012).

2.11 Sequencing

Sequencing merupakan suatu proses melipatgandakan DNA sehingga menjadi ribuan salinan. *Sequencing* merupakan suatu metode berbasis PCR yang bertujuan menentukan urutan nukleotida. Pada dasarnya, ada dua metode yang telah dikembangkan untuk sekuensing DNA, yaitu metode Maxam Gilbert dan metode Sanger. Metode Maxam Gilbert melibatkan prses degradasi kimiawi terhadap fragmen DNA yang akan disekuens sedangkan metode Sanger tidak menggunakan pendekatan degradasi fragmen DNA secara kimiawi tetapi menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu (Muladno 2002 *dalam* Kurnia 2010). Metode sanger diawali dengan proses PCR yang dibagi tiga bagian yaitu denaturasi, annealing, dan elongasi. Komponen lain yang ditambahkan adalah dNTP (dideoxynucleoside triphosphate). Komponen dNTP terdiri dari komponen dideoxydenosine, dideoxycytidine, dideoxyguanine, dan dideoxythymidine triphosphate. Jika salah satu dari komponen dNTP bereaksi dengan salah satu komponen dNTP maka sintesis DNA tidak dapat terjadi (Barnum 2005 *dalam* Kurnia 2010). Sekuensing merupakan suatu metode untuk mengetahui urutan basa nukleotida (Gill 2007).

2.12 Road Map Penelitian Sebelumnya

Road map penelitian sebelumnya dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Road Map Penelitian sebelumnya

Judul	Peneliti	Sumber	Hasil
Analisa Genus dan Penyakit Karang di Perairan Pulau Tuan Kecamatan Peukan Bada Kabupaten Aceh Besar	Aldyza, N dan Afkar 2015	<i>Jurnal Biotik</i> 3 (2): 107-115	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa terumbu karang yang terdapat di perairan Pulau Tuan Kecamatan Peukan Bada Kabupaten Aceh Besar terdiri dari 5 genus, dan penyakit karang di Perairan Pulau Tuan terdiri dari 6 jenis penyakit.
Karakteristik Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit Pink-Blotch di P. Sambangan, Karimunjawa	Soenardjo, N 2013	<i>Buletin Oseanografi Marina</i> 2:58-65	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan syndrome penyakit pink-blotch adalah genus <i>Erythrobacter</i> sp.
Karakteristik dan Bioaktif Antibakteri Senyawa Spons <i>Haliclona</i> sp. dari Teluk Manado	Wewengkang et al 2014	<i>Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi</i> 1 (1):1-15	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar, fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri <i>Staphylococcus aerus</i> sedangkan fraksi kloroform dan fraksi metanol efektif menghambat bakteri <i>Escherichia coli</i> dan dikategorikn kuat berdasarkan kriteria David dan Stoud. Karakteristik senyawa yang terlihat pada fraksi metanol yang merupakan fraksi aktivitas antibakteri paling besar mengandung gugus utama N-H, C-H, C-O, C=O dan diduga

Uji Aktivitas Antibakteri Pigmen Karotenoid dari Isolat Bakteri Simbion Karang Lunak <i>Sarcophyton</i> sp. Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Staphylococcus aerus</i> ATCC 25923	Wiguna <i>et al</i> 2016	IJPST 3(3)1-7		mengandung senyawa alkaloid yang berpotensi sebagai antibakteri. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak pigmen karotenoid bakteri simbion karang lunak <i>Sarcophyton</i> sp dengan kode isolat CBSCP 23 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Staphylococcus aerus</i> ATCC 25923. Adanya perbedaan konsentrasi ekstrak uji yang menghasilkan diameter hambat yang berbeda dalam hal ini semakin meningkat konsentrasi ekstrak uji yang digunakan menghasilkan kenaikan diameter hambat yang terbentuk, menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.
Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Karang Terhadap Bakteri yang di Isolasi dari Karang terserang Penyakit <i>Ulcerative white spots</i> di Perairan Pulau Panjang, Jepara	Pamungka <i>et al</i> 2014	<i>Journal of Marine Research</i> 3(3):254-264.	3	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat FSB 2.5 dan GSB 2.2.1 merupakan isolat unggul yang mampu menghambat pertumbuhan isolat bakteri karang terserang penyakit UWS. Hasil karakteristik biokimia menunjukkan bahwa isolat FSB 2.5 dan GSB 2.2.1 termasuk dalam genus <i>Pseudomonas</i> .
Karakteristik Molekuler Bakteri	Sabdono dan Radjasa 2006	Jurnal Kelautan	Ilmu 11	Dari hasil penelitian menunjukkan bakteri <i>Myroides odoratimimus</i> strain BBDI, <i>Bacillus algicola</i> strain BBD2 dan Marine <i>Alcaligenaceae</i> .

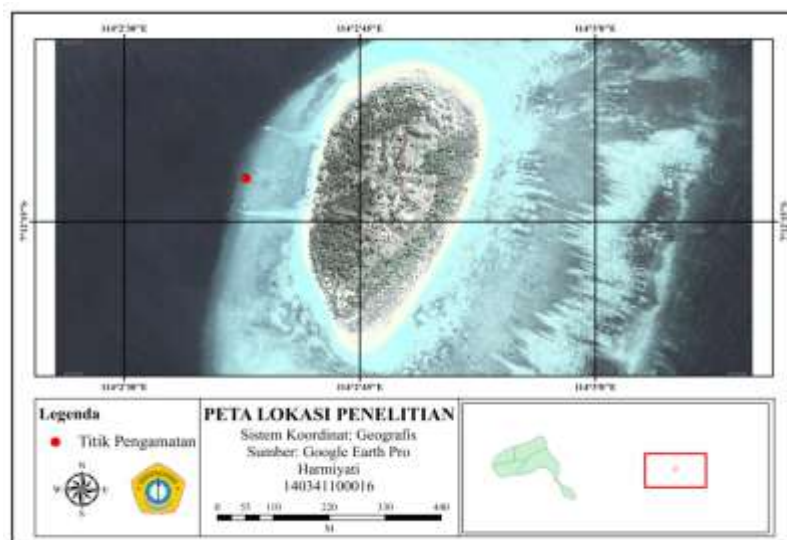
yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (<i>Black Band Disease</i>) pada Karang <i>Acropora</i> sp di Perairan Karimun Jawa		(3):158-162.		<i>bacterium</i> strain BBD3 merupakan bakteri yang berasosiasi dengan BBD di perairan Karimun Jawa.
Struktur Komunitas dan Penyakit Pada Karang (Scleractinia) di Perairan Lembata, Nusa Tenggara Timur	Abrar <i>et al</i> 2012	Jurnal Kelautan (2):109-118	Ilmu 17	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa perairan Lembata memiliki jenis karang keanekaragaman cukup tinggi, dimana pada bagian timur kondisinya lebih baik daripada bagian barat. Infeksi penyakit dan gangguan kesehatan lebih disebabkan oleh tekanan lingkungan dibanding infeksi oleh mikroba pathogen. Keragaman dan prevalensi penyakit pada beberapa lokasi sangat tinggi dan diprediksi dapat memperburuk kondisi terumbu karang dalam skala lokal
Pemutihan Karang dan Beberapa Penyakit Karang	Siringo-ringo 2007	Oseana 32(4):29-37		Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kejadian pemutihan karang (coral bleaching) dan penyakit karang (coral disease) berkaitan erat dengan perubahan lingkungan, baik dalam skala lokal maupun global. Kerusakan karang dalam skala global regional terjadi dalam periode peningkatan suhu air laut, radiasi UV yaitu tinggi, sedimentasi, dan penyebab stres lainnya.
Skrining Bakteri Berasosiasi dengan Spons <i>Jaspis</i> sp Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba	Abubakar <i>et al</i> 2011	Jurnal Kelautan 35-40	Ilmu 16 (1)	Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 138 isolat bakteri simbiosis spons <i>Jaspis</i> sp yang masing-masing terdiri dari 70 isolat dan 68 isolat permukaan telah berhasil diisolasi. 32 (45,71%) isolat bakteri endofit dan 20 (29,41%) isolat bakteri permukaan dari total isolat menghasilkan senyawa antimikroba terhadap bakteri <i>Staphylococcus aerus</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan EPEC K-11 serta khamir <i>Candida albicans</i> dan <i>C. tropicalis</i> . Lima

Uji Daya Hambat Ekstrak Rumput Laut <i>Gracilaria</i> sp Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Staphylococcus</i> <i>aerus</i>	Toy <i>et al</i> 2015	Jurnal e-GiGi (eG) 3 (1):1-7.	isolat terbaik terdiri dari 4 isolat endofit yaitu SAB E-8, SAB E-35, SAB E-38, dan SAB E-40 serta satu isolat permukaan yaitu SAB S-43. Karakterisasi berdasarkan pengecatan gram, spora dan uji fisiologi menggunakan identification Strip menunjukkan isolat SAB E-8, SAB E-35 dan SAB E-40 adalah genus <i>Pseudomonas</i> sedangkan isolat SAB E-33, SAB E-38 dan SAB S-43 merupakan genus <i>Bacillus</i> . Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak rumput laut <i>Gracilaria</i> sp. tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri <i>Staphylococcus aerus</i>
---	-----------------------	----------------------------------	--

III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2017 untuk pengambilan sampel karang sehat di Pulau Gili Labek Kabupaten Sumenep dan dilanjutkan dengan isolasi bakteri serta uji antibakteri pada bulan Oktober-Desember 2017 di Laboratorium Bioteknologi Ilmu Kelautan Universitas Trunojoyo Madura. Sedangkan untuk analisa molekuler dilakukan pada bulan Desember 2017 di Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Tropical Marine Bioteknologi Universitas Diponegoro Semarang. Untuk lokasi penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Peta Lokasi Penelitian

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1, 3.2, 3.3, 3.4

Tabel 3.1 Alat Lapang yang digunakan pada saat pengambilan sampel

No	Nama alat	Fungsi
1.	Masker dan Snorkel	Skin Diving
2.	Palu dan tatah	Untuk memotong sampel karang
3.	Plastik Ziplock	Untuk tempat sampel karang sehat
4.	Cool box	Untuk menyimpan sampel

Tabel 3.2 Alat Laboratorium

No	Nama alat	Fungsi
1.	Tabung reaksi	Tempat pengenceran sampel
2.	Autoklaf	Untuk sterilisasi alat dan bahan yang digunakan
3.	Inkubator	Memelihara bakteri
4.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel sesuai berat yang sudah ditentukan
5.	Erlenmeyer	Sebagai wadah dalam pembuatan media
6.	Cawan petri	Tempat isolasi bakteri
7.	Api Bunsen	Digunakan sebagai pembakar
8.	Spatula	Sebagai pengaduk
9.	Pipet volume	Mengambil larutan
10.	Jarum inokulasi	Mengambil koloni bakteri
11.	Mikropipet	Mengukur volume
12.	Spreader	Meratakan biakan
13.	Mikropipet	Mengukur volume skala mikro
14.	Laminar flow	Ruangan kultur
15.	Inkubator	Tempat inkubasi
16.	Hot plate	Memanas media
17.	Stirer	Mengaduk media
18.	Rak tabung reaksi	Tempat tabung reaksi
19.	Spidol marker	Pelabelan
20.	Plastik wrap	Untuk membungkus cawan petri
21.	Aluminium foil	Digunakan sebagai pembungkus dan menimbang media
22.	Kertas label	Untuk melabeli sampel
23.	Tubes	Pasangan dari mikropipet untuk mengambil sampel

Tabel 3.3 Alat Identifikasi Molekuler 16s rDNA

No	Nama alat	Fungsi
1.	Mikro tube	Tempat sampel
2.	Centrifuge	Sebagai peluruh ekstrak
3.	Thermal cycler	Mesin PCR (Amplifikasi DNA)
4.	Elektroforesis	Mengetahui adanya Band pada sampel (Pembaca elektro)
5.	Vortex	Homogenisasi
6.	Gel Doc	Visualisasi berkas DNA
7.	Nanodrop	Mengetahui kemurnian DNA

Tabel 3.4 Alat Uji Antibakteri

No	Nama alat	Fungsi
1.	Jarum Ose	Untuk mengambil bakteri
2.	Bunsen	Untuk fiksasi
3.	Mikropipet	Untuk mengambil sampel
4.	Tip	Sebagai tempat tube
5.	Penggaris	Sebagai alat untuk mengukur
6.	Gel Doc	Visualisasi berkas DNA
7.	Cawan petri	Media Bakteri
8.	Spreader	Meratakan Biakan

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan pada saat preparasi sampel karang sehat, bahan pada saat isolasi bakteri dan bahan yang digunakan pada saat identifikasi 16s rDNA yang dapat ditampilkan pada tabel 3.5, 3.6, 3.7

Tabel 3.5 Bahan yang digunakan preparasi sampel karang sehat

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	Sampel Karang Sehat	Objek penelitian

Tabel 3.6 Bahan yang digunakan isolasi bakteri

No	Bahan	Fungsi
1.	Bacto Peptone	Untuk pembuatan media
2.	Bacto Yeast Exctrat	Untuk pembuatan media
3.	Bacto Agar	Untuk pembuatan media
4.	Alkohol 70%	Unuk sterilisasi aseptis
5.	Karang Lunak	Sampel
6.	Spirtus	Untuk bahan bakar Bunsen
7.	Air Laut Steril	Untuk seri pengenceran

Tabel 3.7 Bahan yang digunakan pada saat uji aktivitas antibakteri

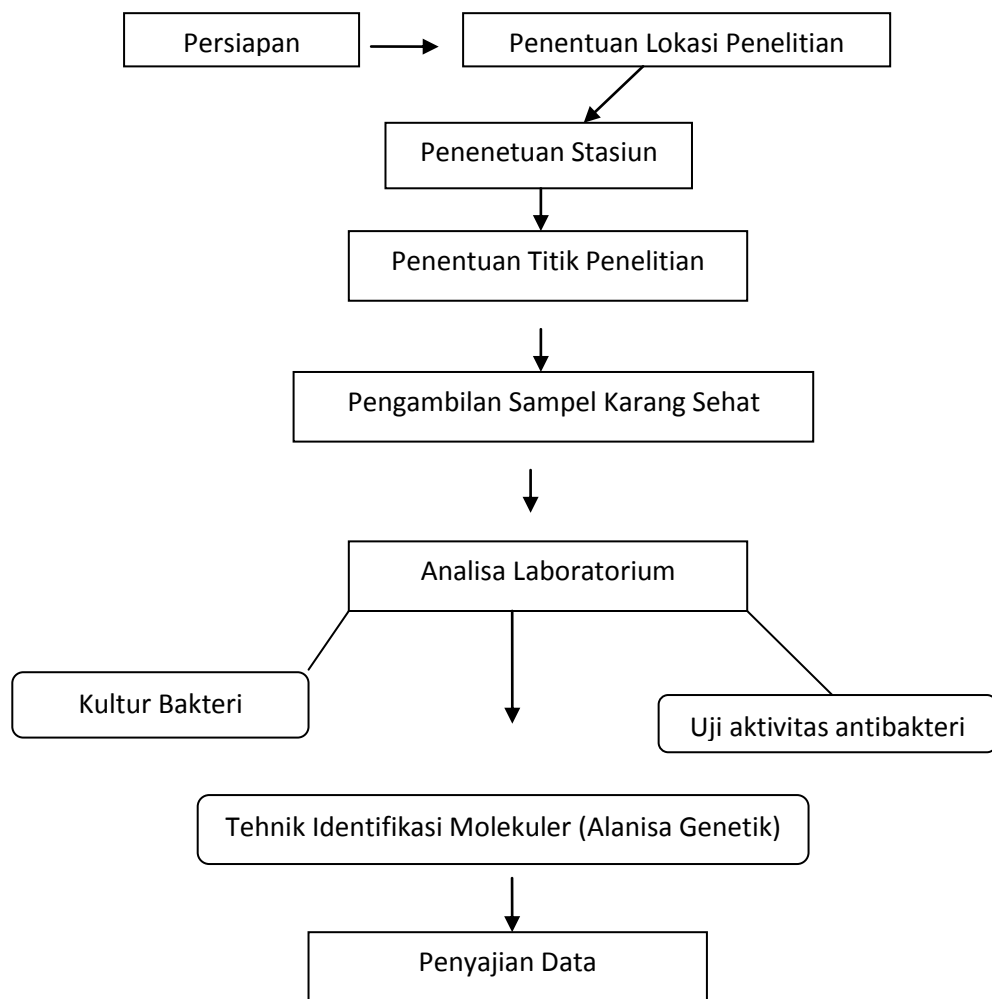
No	Nama alat	Fungsi
1.	Media Zobell padat di petri	Media yang digunakan dalam uji antibakteri
2.	Alkohol	Untuk sterilisasi agar terhindar dari kontaminasi
3.	Spirtus	Sebagai bahan bakar api bunsen
4.	Isolat bakteri patogen	Sampel isolat uji
5.	Isolat bakteri baik	Sampel bakteri baik yang akan di uji dengan sampel isolat bakteri patogen
6.	Media Zobell soft agar (masih cair)	Bahan yang digunakan dalam uji bakteri
7.	Media Zobell cair di tabung atau erlenmeyer	Sebagai media
8.	Wrap	Untuk mmebungkus alat yang digunakan agar terhindar dari kontaminasi

Tabel 3.8 Bahan yang digunakan untuk identifikasi berdasarkan analisa 16s rDNA

No	Bahan	Fungsi
1.	DdH ₂ O	Sebagai penyangga
2.	Primer 27F dan 1492R	Primer
3.	Kappa/Promega	Digunakan sebagai Reagen saat proses PCR
4.	DNA Template	Sampel DNA
5.	Ethidium bromide	Sampel
6.	Loading Dye	Marker
7.	Agarose	Gel elektroforesis
8.	Buffer TAE	Larutan dalam elektroforesis
9.	Saponin	Digunakan Ekstraksi DNA
10.	PBS	Digunakan Ekstraksi DNA
11.	Chelex	Ekstraksi Dna

3.3 Prosedur Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data penelitian dilakukan secara langsung. Pertama kali yang harus dilakukan adalah survei lokasi penelitian. Survei bertujuan untuk menentukan keberadaan terumbu karang yang masih dalam keadaan sehat serta penentuan lokasi pengamatan. Sedangkan identifikasi karang menggunakan coral finder (Kelley 2009) dan Veron (2000). Alur penelitian dapat ditampilkan pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.4 Pengambilan Sampel Karang Sehat

Pengambilan sampel karang sehat dilakukan dengan *Skin diving* pada kedalaman 3-4 meter. Sampel kemudian dimasukkan kedalam kantong plastik yang berisi air laut. Kemudian disimpan di dalam cool box. Selanjutnya dibawa ke Laboratorium Bioteknologi Kelautan Universitas Trunojoyo Madura untuk dilakukan analisa lanjutan. Sedangkan untuk sampel karang sakit menggunakan karang *Porites* sp yang terserang penyakit *White plague* dengan bakteri patogen *Bacillus firmus*, *Bacillus pseudomycolides*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans* yang didapatkan dari Insafitri *personal communication*.

3.5 Preparasi Sampel

Sampel karang yang sudah diambil di lokasi penelitian lalu dipotong kecil-kecil $\pm$ 3-5 cm. Sampel dibersihkan dengan air laut steril dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada sampel karang. Sampel ditumbuk dengan menggunakan mortir steril, kemudian sampel dimasukkan ke dalam air laut steril, dan selanjutnya sampel diambil 1 ml menggunakan mikropipet dan memasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi cairan zobell, kemudian sampel diberi label (Sabdono 2009).

3.6 Pembuatan Media Zobell

Media adalah suatu substansi yang komposisinya terdiri dari nutrisi tertentu yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat bakteri. Dalam pembuatan media pada penelitian ini menggunakan media dari zobell dengan tujuan untuk menumbuhkan bakteri yang diambil dari karang sehat *Porites attenuata*. Bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu 2,5 gr bacto pepton, 0,5 gr bacto yeast extracts, dan 15 gr agar. Semua bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan air laut steril 500 ml. Kemudian cairan hasil campuran di dalam erlenmeyer di panaskan dengan menggunakan hotplate dengan suhu 180°C . Kemudian media di sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tujuan untuk mencegah kontaminasi (Sutama 2000).

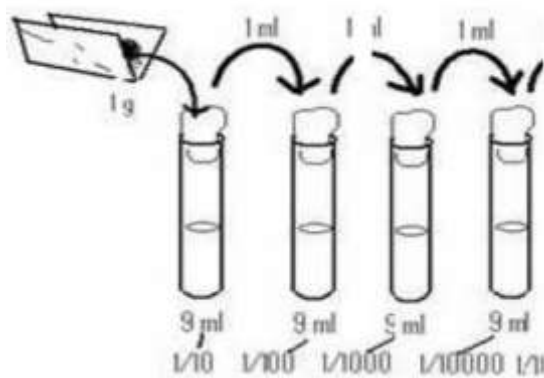
3.7 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dengan cara mencuci semua alat yang digunakan pada saat isolasi bakteri. Semua alat yang digunakan dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan atm selama 15 menit.

3.8 Pengenceran

Sampel yang berisi cairan zobell kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air laut steril. Selanjutnya melakukan pengenceran pertama yaitu dengan cara mengambil 1 ml cairan zobell kemudian memasukkan ke dalam 9 ml air laut steril ke dalam tabung pengenceran 10^{-1} dengan menggunakan mikropipet dan kemudian di mix agar cairan homogen. Selanjutnya mengambil 1 ml dari tabung pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam tabung pengenceran

10^{-2} dengan menggunakan mikropipet dan kemudian di mix. Selanjutnya mengambil 1 ml dari tabung pengenceran 10^{-2} dan dimasukkan kedalam tabung pengenceran 10^{-3} di mix kembali. Demikian seterusnya hingga diperoleh pengenceran 10^{-10} (Pamungkas *et al* 2014). Alur pengenceran dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Gambar 3.3). Hasil pengenceran dari 10^1 - 10^{10} yang diambil untuk proses isolasi hanya 3 tabung pengenceran yaitu tabung pengenceran 10^5 , 10^7 , dan 10^{10} . Dari ketiga pengenceran tersebut diharapkan bakteri tumbuh dengan baik dan tidak menumpuk, sehingga akan mempermudah dalam identifikasi morfologi bakteri.



Gambar 3.3 Pengenceran sampel (Usman 2015)

3.9 Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan dengan mengambil dari hasil pengenceran yang sudah diencerkan sebelumnya yaitu pengenceran 10^5 , 10^7 , dan 10^{10} . Kemudian pengenceran tersebut menggunakan metode pourplate dengan cara sampel diambil sebanyak 100 ml dengan menggunakan mikropipet, kemudian dihomogenkan dengan cara cawan petri digoyang dengan bentuk angka 8, diisolasi pada media Zobell 2216E yang disiapkan di dalam cawan petri steril dan diinkubasi selama 2×254 jam pada suhu 37° (Pamungkas *et al* 2014). Untuk menghindari kontaminasi maka cawan petri dibungkus dengan menggunakan wrap. Menurut Radjasa *et al* (2013) menjelaskan bahwa sampel isolasi bakteri setelah diinkubasi dan koloni yang tumbuh diamati bentuk dan permukaan koloninya. Setiap koloni yang mempunyai bentuk dan warna yang berbeda dipisahkan. Purifikasi bakteri menggunakan metode streak yaitu purifikasi koloni-koloni bakteri yang

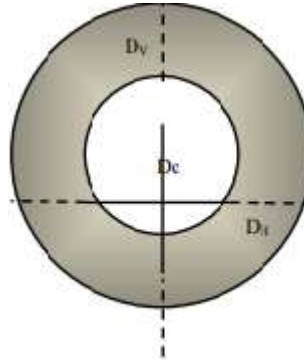
dipisahkan dengan jarum ose berdasarkan perbedaan warna, tekstur, dan bentuk koloni pada media zobell dalam cawan petri. Setelah didapatkan isolat bakteri murni maka disimpan kedalam media agar miring (Pamungkas *et al* 2014).

3.10 Uji Aktivitas Antibakteri Karang Sehat (*Porites attenuata*)

Metode uji antibakteri menggunakan dua metode yaitu metode overlay dan difusi agar. Metode overlay merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui adanya potensi antibakteri pada karang yang diuji, sedangkan uji difusi agar merupakan uji lanjutan untuk mengetahui seberapa besar potensi antibakteri. Langkah-langkah sebelum uji overlay adalah sebagai berikut yaitu menyiapkan alat dan bahan, gambar garis dan diberi nama isolat. Kemudian tanam isolat bakteri baik (karang sehat) menggunakan ose bundar pada petri, setelah itu petri dibungkus dengan plastik wrap dan di inkubasi selama 2×24 jam. Tanam 1 isolat bakteri patogen ke media cair zobell di tabung rekasi, diinkubasi dengan di gojok (shake) pada orbital dan shaker 2×24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan uji overlay dengan cara menyiapkan media zobell soft agar di erlenmeyer. Mengambil isolat bakteri patogen yang telah di tanam di media sebanyak 1% dari jumlah media soft agar, kemudian tuang soft agar ke dalam cawan petri yang telah ditanami bakteri karang sehat, lalu diratakan, diinkubasi selama 2×24 jam kemudian diamati perkembangannya. Isolat bakteri karang sehat yang aktif ditandai dengan terbentuknya zona bening (hambat). Kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan metode difusi agar (Sabdono dan Radjasa 2006).

Metode difusi agar merupakan metode lanjutan dari metode overlay dengan langkah-langkah sebagai berikut, yaitu mengambil sedikit isolat patogen dan bakteri karang sehat dan kemudian masing-masing ditanam pada media cair, keduanya digijok (shaker) 2×24 jam, lalu kemudian di uji dengan cara mengambil 100 ml isolat bakteri patogen yang ada di media cair, spread diatas media zobel padat, tunggu kurang lebih 10 menit agar bakteri berdifusi ke media. Kemudian membakar pinset, selanjutnya meletakkan kertas cakram steril diatas permukaan media agar zobel yang sudah padat. Setelah itu 10 µl bakteri karang sehat di teteskan diatas cakram ukuran 6 mm dengan menggunakan mikropipet yang telah diletakkan di media padat, kemudian seal cawan petri dengan menggunakan wrap dan diinkubasi selama 2×24 jam dan diamati pembentukan zona hambatnya. Zona

hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan mm (Toy *et al* 2015). Gambar pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Gambar 3.4



Gambar 3.4 Pengukuran diameter zona hambat (Toy *et al* 2015)

Keterangan :



: Zona hambat

D_V : Diameter vertikal

D_H : Diameter horizontal

D_C : Diamter cakram

Diemeter zona hambat diukur dengan rumus (Toy 2015):

$$\frac{(D_V - D_C) + (D_H - D_C)}{3}$$

3.11 Identifikasi Molekuler DNA

3.11.1 Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA murni tanpa bahan pengotor yang berupa protein maupun RNA. Ekstraksi DNA dilakukan di Universitas Diponegoro dengan menggunakan metode chelex. Metode chelex merupakan ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan larutan chelex. Larutan chelex 10% yang dibuat oleh pencampuran resin chelex yang diproduksi oleh BioRad dan larutan H_2O dan campuran ini dimasukkan ke tube chelex. (Walsh *et al* 1991).

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengambil sel bakteri di cawan petri kemudian ditambahkan 100 μ l dd H_2O . Selanjutnya ditambahkan 1 ml saponin 0,5% dan didiamkan semalam pada suhu 40°C. Sampel kemudian dicentrifuge

selama 10 menit dengan kecepatan 1.2000 RPM (buang supernatant). Tambahkan 1000µl ddH₂O dan 50µl chelex 20%. Sampel selanjutnya dipanaskan selama 10 menit dengan kecepatan 1.2000 RPM. Pindahkan supernatant pada tube yang berisi (DNA templete), kemudian disimpan pada suhu -20°C. Djohan (2012) menjelaskan bahwa supernatant yang mengandung genom DNA dipindah ke tube yang baru dan jika templete tidak langsung digunakan maka harus disimpan pada suhu -20°C.

3.11.2 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan memasukkan primer 27F dan primer 1492R kedalam tube steril masing-masing 2µl dan ditambahkan 6 ml ddH₂O. Kemudian ditambahkan sampel hasil ekstraksi sebanyak 2,5µl dan terakhir tambahkan Kapa/Promega sebanyak 12,5µl sehingga total volume di dalam tube adalah 25µl. Analisa PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yaitu tahap pradenturasi selama 3 menit dengan suhu 95°C selama 1 menit pada suhu 720°C selama 7 menit (Kurnia 2010).

Sampel yang sudah di analisa PCR selanjutnya dilihat kemurnian DNANYa dengan menggunakan Nanodrop. Selajutnya sampel dielektroforesis untuk melihat berkas DNA. Elektroforesis membutuhkan media agarose sebanyak 1% dari total volume yang dipakai. Gel elektroforesis terdiri dari agarose sebanyak 0.8 gr dan buffer TAE sebanyak 80ml. Sampel kemudian dimasukkan kedalam sumuran yang ada pada gel elektroforesis sebanyak 2µl dan dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel elektroforesis direndam dalam larutan EtBr sebanyak selama 15 menit (Kurnia 2010).

3.11.3 Elektroforesis

Sampel yang sudah dianalisa PCR selanjutnya dilihat kemurnian DNA nya dengan menggunakan Nanodrop. Selajutnya sampel dielektroforesis untuk melihat berkas DNA. Elektroforesis membutuhkan media agarose sebanyak 1% dari total volume yang dipakai. Gel elektroforesis terdiri dari agarose sebanyak 0.8 gr dan buffer TAE sebanyak 80ml. Sampel kemudian dimasukkan kedalam sumuran yang ada pada gel elektroforesis sebanyak 2µl dan dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel elektroforesis

direndam dalam larutan EtBr sebanyak 4µl selama 15 menit. Setelah selesai gel diletakkan pada UV transluminator untuk melihat pita band hasil analisa PCR

3.11.4 Sequencing

Sampel yang sudah diamplifikasi akan dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk dianalisa sekuensing. Istilah sekuensing mengacu pada metode untuk menentukan urutan nukleotida yakni adenin, guanin, sitosin, dan timin dalam molekul DNA. Urutan DNA pertama kali ditemukan pada awal tahun 1970an. Dengan pengembangan sekuensing pewarna dengan analisis otomatis, sekuensing DNA menjadi lebih mudah dan cepat (Munshi 2012). Hasil dari sekuensing ini selanjutnya dapat digunakan untuk membuat pohon filogenetik

3.11.5 Analisis Filogenetik

Hasil sekuen 16s rDNA dari sampel selanjutnya dianalisis menggunakan Program MEGA 5. Program ini dapat didownload secara gratis di <http://www.megasoftware.net>. Analisa BLAST digunakan untuk melihat referensi sekaligus untuk membuat pohon filogenetik. Pohon filogenetik digunakan untuk melihat tingkat kekerabatan antar DNA sampel dan DNA dalam gen bank. Dharmayanti (2011) menjelaskan bahwa kontruksi filogenetik sangat penting dan menarik dalam studi evolusi. Filogenetik digambarkan sebagai klasifikasi taksonomi dari organisme berdasarkan sejarah evolusi mereka. Sehingga kekerabatan organisme satu dengan yang lain dapat diketahui.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Gambaran Umum Lokasi Penelitian

Pulau Gili Labek merupakan pulau yang terletak di Desa Kombang, Kecamatan Talango, Kabupaten Sumenep dengan luas ± 5 ha yang terletak diantara $7^{\circ}12'1.03''$ - $7^{\circ}12'35.14''$ LS dan $114^{\circ}2'35.86''$ - $114^{\circ}3'6'.59''$ BT. Secara administrasi, Pulau Gili Labek dihuni oleh sekitar 44 kepala keluarga (KK), terdiri dari satu rukun tetangga (RT), dan satu rukun warga (RW) dan hanya terdapat satu Dusun, yaitu Dusun Gili Labak (Kurniawan *et al* 2017). Untuk sampai dipulau ke pulau ini melalui jalur laut dengan menggunakan perahu nelayan dengan waktu tempuh $\pm 1,5$ jam dari pelabuhan Kalianget. Jika dari pelabuhan Desa Tanjung di Kecamatan Saronggi dapat menempuh ± 1 jam. Dapat pula melalui jalur pelabuhan Desa Kombang di Kecamatan Talango dengan waktu tempuh ± 1 jam. Pulau Gili Labek dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Pulau Gili Labek (Handoko 2017)

Pulau Gili Labek merupakan salah satu pulau yang telah menjadi destinasi wisatawan, karena memiliki potensi alam yang menarik baik di darat maupun di laut. Letak pulau yang dekat dengan daratan utama menjadikan pulau kecil ini sebagai tujuan baru wisata, sehingga meningkatkan pengunjung lokal maupun regional dan menciptakan sumber ekonomi baru. Namun untuk saat ini pulau Gili Labek dikenal dengan wisata bahari baik itu wisata pantai (snorkling) maupun bawah laut (diving) karena mempunyai keanekaragaman bawah laut yang cukup bagus salah satunya terumbu karang, sehingga menarik para wisatawan untuk

melihat keindahan bawah laut di pulau Gili Labek. Kegiatan wisatawan dapat memberikan dampak negatif pada kehidupan terumbu karang salah satunya terjadinya kerusakan pada karang. Dalam Penelitian Abidin (2015) menjelaskan bahwa persen penutupan terumbu karang di pulau Gili Labek daerah winward pada perairan dangkal adalah 30% dan 15% pada perairan dalam, keduanya termasuk kategori rusak. Sedangkan untuk daerah leeward sendiri pada perairan dangkal adalah 74% (kategori baik) dan pada perairan dalam adalah 39% (kategori sedang).

Kerusakan terumbu karang juga disebabkan oleh penyakit karang. Pada terumbu karang yang terinfeksi penyakit karang ditandai dengan adanya perubahan warna yang mencolok. Menurut Insafitri (2017) melalui *personal communication* menjelaskan bahwa salah satu penyakit karang yang menyerang karang di Pulau Gili Labek adalah penyakit *White plague*. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri patogen. Jika kondisi ini dibiarkan terus-menerus maka dapat menimbulkan berkurangnya keanekaragaman terumbu karang di Pulau Gili Labek. Jadi diperlukan suatu penelitian untuk mengatasi bakteri penyebab penyakit karang salah satunya adalah dengan menggunakan antibakteri. Sampel karang sehat yang digunakan adalah *Porites attenuata* seperti pada Gambar 4.2

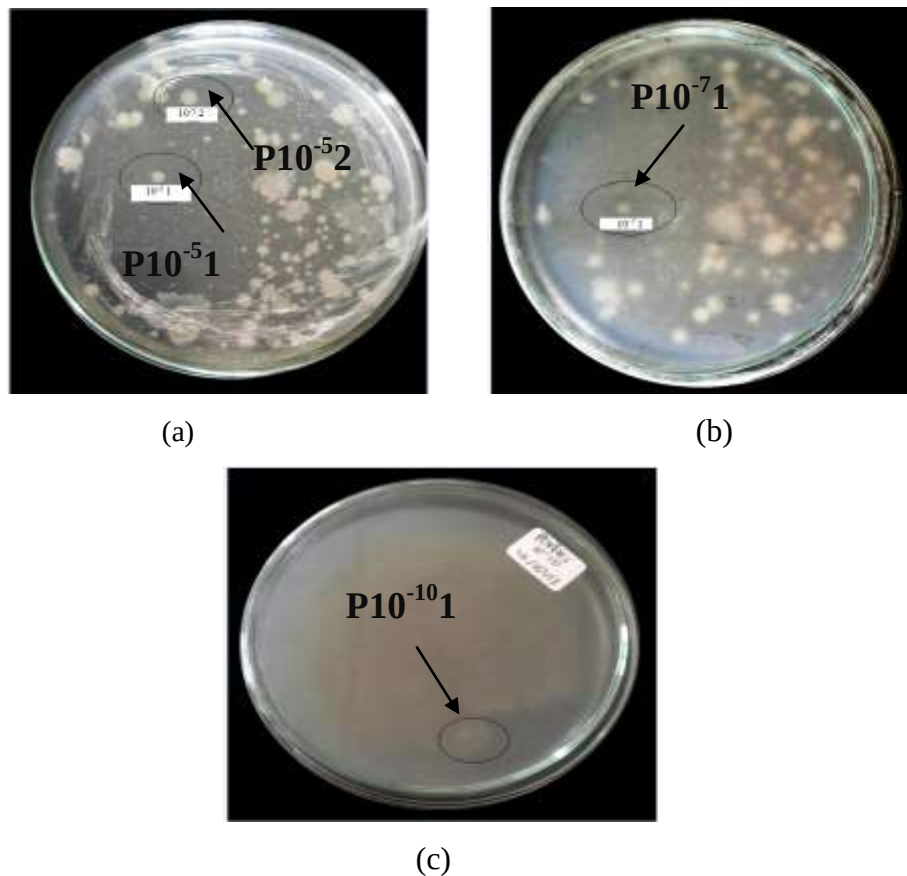


Gambar 4.2 Foto *Porites attenuata*

4.2 Bakteri Karang Sehat yang Berasosiasi dengan Karang *Porites attenuata*

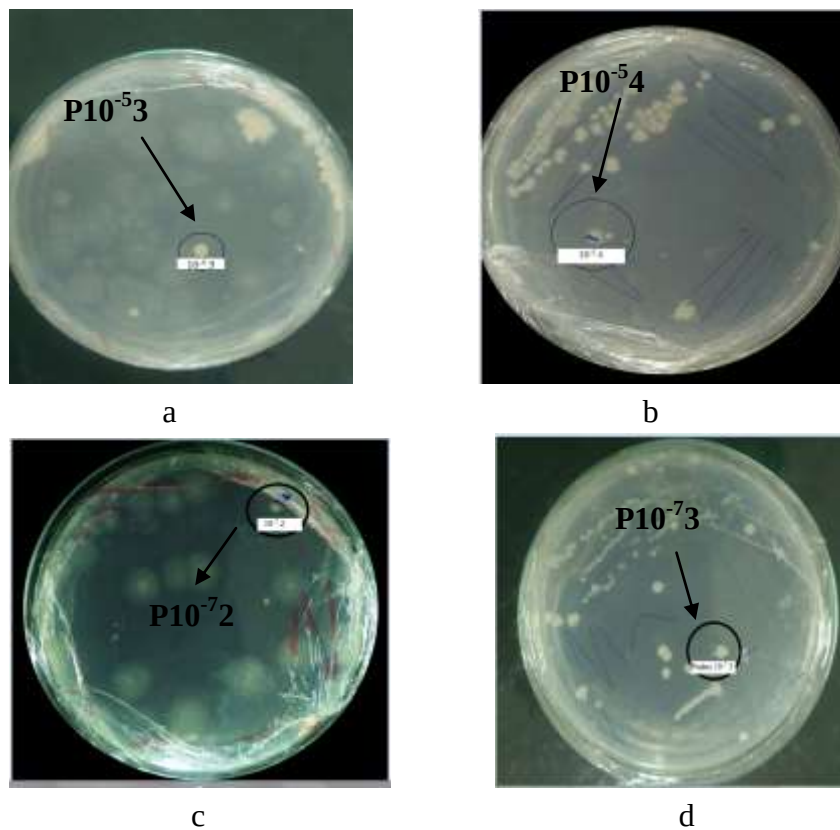
Isolasi merupakan pengambilan bakteri atau memindahkan suatu mikroba dari alam dan menumbuhkannya sebagai biakan murni dalam medium buatan (Fitri dan Yekki 2011). Gambar 4.3 merupakan hasil pengamatan bakteri yang

berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* dari pengenceran 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-10} . Bagian (a) adalah isolat $P10^{-5}1$ dan $P10^{-5}2$ yang merupakan hasil isolasi dari bakteri $P10^{-5}$. Bagian (b) adalah isolat $P10^{-7}1$ yang merupakan hasil isolat dari $P10^{-7}$. Sedangkan bagian (c) adalah hasil isolat $P10^{-10}1$ yang merupakan hasil isolat $P10^{-10}$. Dari isolasi yang dilakukan, dihasilkan beberapa koloni yang berbeda.



Gambar 4.3 Hasil isolasi bakteri *Porites attenuata* (a) $P10^{-5}1$ dan $P10^{-5}2$ (b) $P10^{-7}1$ (c) $P10^{-10}1$

Metode purifikasi merupakan metode yang bertujuan untuk memperoleh koloni bakteri murni. Pemurnian isolat mempunyai tujuan untuk mendapatkan biakan murni (Fitri dan Yasmin 2011). Lay (1994) menjelaskan bahwa biakan murni pada bakteri merupakan biakan yang hanya mengandung satu jenis bakteri. Gambar 4.4 bagian (a) $P10^{-5}3$, (b) $10^{-5}4$, (c) $P10^{-7}2$, (d) $P10^{-7}3$ merupakan hasil isolasi bakteri yang kemudian dilakukan purifikasi karena beberapa dari isolat tersebut ada yang tumbuh dengan koloni yang menumpuk.



Gambar 4.4 Hasil Purifikasi (a) P10⁻⁵³; (b) P10⁻⁵⁴; (c) P10⁻⁷²; (d) P10⁻⁷³

Berdasarkan pengamatan koloni bakteri didapatkan sebanyak 8 isolat. Isolat bakteri diidentifikasi berdasarkan penampakan dari morfologi seperti bentuk, warna, tepi, dan elevasi. Morfologi koloni yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Morfologi koloni yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata*

No	Kode Isolat	Bentuk	Warna	Tepi	Elevasi
1	P10 ⁻⁵ 1	Bulat	Kuning kemerahan	Halus	Rata
2	P10 ⁻⁵ 2	Bulat	Agak kuning	Halus	Rata
3	P10 ⁻⁵ 3	Bulat	Kuning pekat	Halus	Cembung
4	P10 ⁻⁵ 4	Tidak beraturan	Kuning	Bergelombang	Rata
5	P10 ⁻⁷ 1	Bulat	Putih susu	Halus	Rata
6	P10 ⁻⁷ 2	Bulat	Kuning	Halus	Agak cembung
7	P10 ⁻⁷ 3	Tidak beraturan	Putih susu	Halus	Rata
8	P10 ⁻¹⁰ 1	Bulat	Putih susu	Halus	Rata

Karakteristik bakteri dapat diketahui dengan cara melakukan pengamatan terhadap morfologi koloni bakteri dengan mengetahui ciri-ciri morfologi tersebut akan mempermudah dalam melakukan identifikasi jenis dari bakteri yang diidentifikasi (Fitri dan Yasmin 2011). Sousa et al (2013) Menjelaskan bahwa identifikasi morfologi koloni dengan cara melihat ukuran koloni, bentuk, warna, tekstur dan margin. Bakteri. Bentuk umum bakteri adalah berbentuk *coccus* (bulat) dan *spiral* (batang).

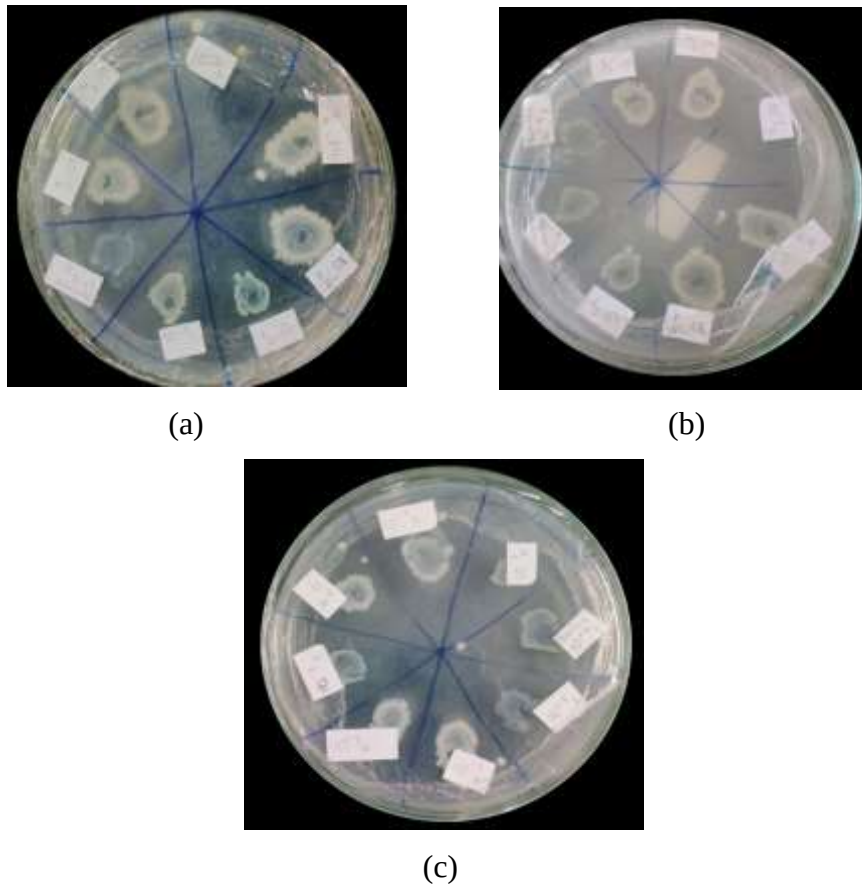
Hasil pengamatan bakteri secara makroskopis dapat dilihat pada Tabel 4.1. Tabel tersebut menunjukkan dari hasil pengamatan koloni bakteri didapatkan beberapa bentuk koloni yaitu bulat, bulat bergerigi, tak beraturan. Tepi koloni isolat bakteri ada yang halus dan bergelombang. Warna isolat yang diamati ada yang berwarna kuning kemerahan, kuning, kuning pekat, agak kuning, dan putih susu. Elevasi yang diamati dari samping terlihat cembung dan rata. Berdasarkan pengamatan hasil identifikasi morfologi yang sudah dilakukan, bentuk koloni yang ditemukan pada penelitian ini sesuai yang dijelaskan oleh Tshikudo et al (2013) bahwa morfologi koloni bakteri pada media agar padat umumnya berbentuk circular, irregular, filamentous dan rhizoid. Ukuran diameter koloni meliputi kecil, besar, dan sedang. Elevasi berbentuk raised, convex, flat, umbonate, crateriform. Margin berbentuk entire, undulate, filiform, curled, dan lobate. Tingkat pertumbuhan (sedikit, sedang atau berlimpah) dan sifat (diskrit atau konfluen, filiform, spreading atau rhizoid). Bakteri yang dominan tumbuh adalah bakteri coccus (bulat). Kehadiran bakteri coccus (bulat) karena bakteri ini tidak memiliki alat gerak sehingga untuk mempertahankan hidupnya dengan cara melekatkan diri pada suatu benda yang ada di perairan (Jailani 2014) seperti dalam pernyataan Hutching dan Saenger (1987) bahwa kebanyakan dari bakteri yang berbentuk coccus (bulat) terikat atau bergabung sesamanya untuk membentuk permukaan yang solid (kuat) karena adanya bahan-bahan berlendir sel-sel terikat. Selanjutnya bentuk bakteri batang (bacil) yang di temukan kemungkinan karena bakteri tersebut memiliki flagel yang digunakan sebagai alat gerak untuk mendapatkan tempat pelekatan (Rizaldi 2016). Flagellum memungkinkan (mengarahkan) bakteri untuk dapat bergerak menuju kondisi yang lingkungannya menguntungkan atau menghindari dari lingkungan yang merugikan

kehidupannya (Aryulina 2005). Bakteri laut umumnya memiliki kecenderungan berasosiasi dengan lapisan permukaan padat seperti rumput laut, lamun, terumbu karang dan tanaman mangrove (Fardiaz 1989).

4.3 Aktivitas Bakteri Karang *Porites attenuata*

Mikroba penghasil antibiotika dapat berupa fungi maupun bakteri yang biasanya bersimbiosis dengan organisme lain (Wiguna *et al* 2016). Sedangkan menurut Murniasih (2005) bahwa asosiasi bakteri dengan organisme laut dapat mempengaruhi metabolisme, oleh karena itu bakteri asosiasi memiliki kecenderungan menghasilkan senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai pertahanan terhadap patogen dan organisme fouling.

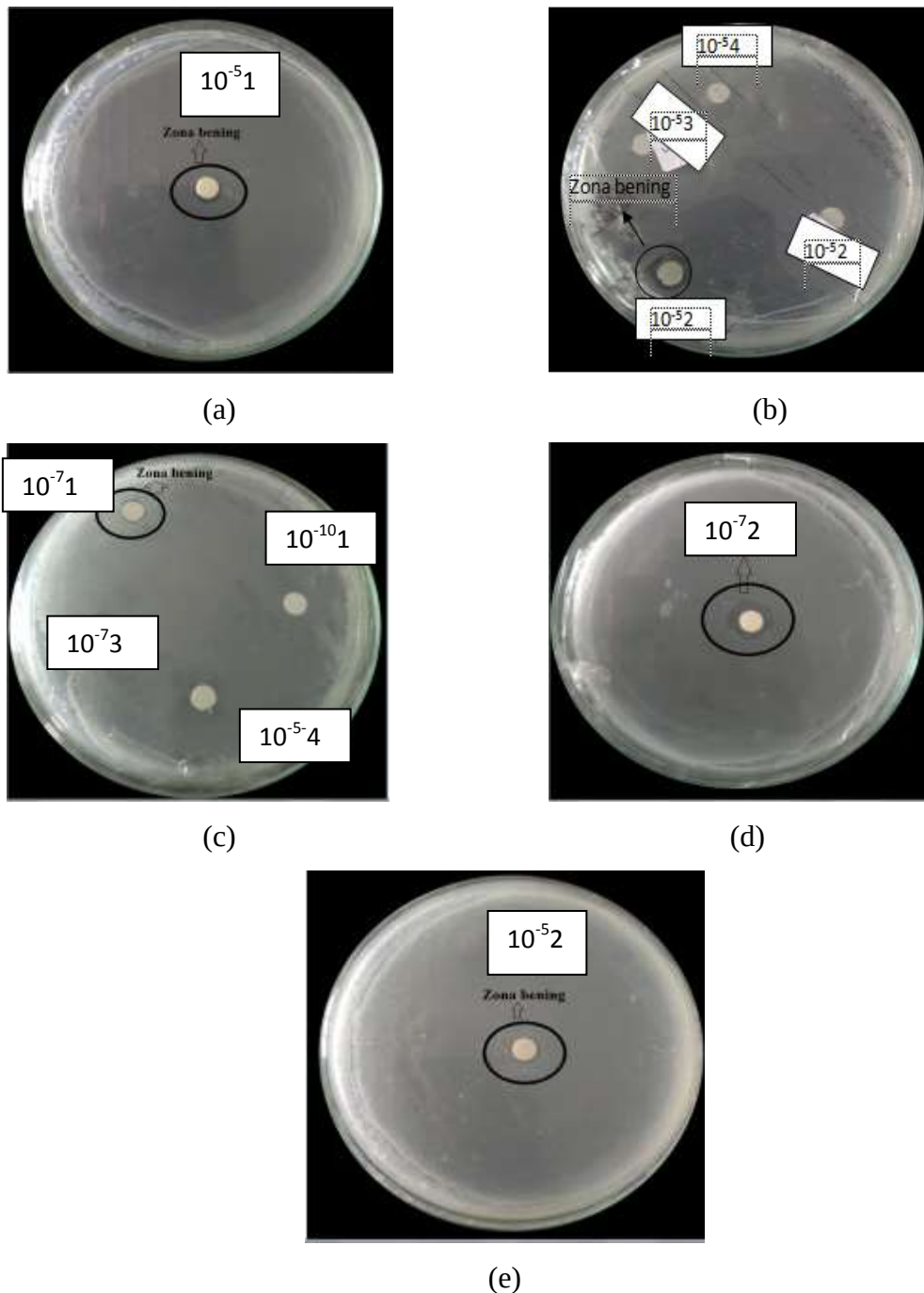
Uji aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* menggunakan dua metode uji yaitu overlay dan difusi agar. Uji overlay merupakan uji pendahuluan kemudian dilanjutkan dengan uji konfirmasi yaitu dengan menggunakan uji difusi agar. Dari delapan isolat bakteri karang sehat spesies *Porites attenuata* yaitu isolat P10⁻⁵1, P10⁻⁵2, P10⁻⁵3, P10⁻⁵4, P10⁻⁷1, P10⁻⁷2, P10⁻⁷3, dan P10⁻¹⁰1 diuji dengan tiga bakteri patogen *Bacillus firmus*, *Bacillus pseudomycolides*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans* yang berasosiasi dengan karang *Porites* sp. Hasil uji overlay dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil uji overlay 3 bakteri patogen dengan *Porites attenuata* ($P10^{-5}1$, $P10^{-5}2$, $P10^{-5}3$, $P10^{-5}4$, $P10^{-7}1$, $P10^{-7}2$, $P10^{-7}3$, $P10^{-10}1$) (a) *Bacillus firmus* dengan semua *Porites attenuate* (b) *Bacillus pseudomycoloides* dengan semua *Porites attenuate* (c) *Corynebacterium ureicelerivorans* dengan semua *Porites attenuata*

Tehnik Overlay telah dikembangkan lebih dari 70 tahun yang lalu dan sudah banyak diterapkan dibebberapa bidang penelitian mikrobiologi, termasuk bakteriofag dan bakteriosin. Selain itu, tehnik ini terbilang sederhana, murah, dan penggunaan bahan yang relatif sedikit serta dan mudah ditafsirkan. Aktivitas antibakteri biasanya ditandai dengan adanya zona bening (zona hambat) disekitar paper disk (Hocket dan David 2017). Gambar 4.5 bagian (a), bagian (b), dan bagian (c) merupakan bakteri hasil uji overlay yang sudah dilakukan untuk semua isolat. Dari hasil tersebut tidak ditemukan adanya zona bening pada isolat yang diuji. Hal ini kemungkinan terjadi beberapa kesalah pada saat pelaksanaan pengujian overlay, baik dari penggunaan media dan suhu yang digunakan. Kemudian dilakukan uji konfirmasi dengan ,metode difusi agar dengan tujuan

untuk mengetahui kebenaran dari isolat yang aktif mengandung antibakteri. Hasil difusi agar dapat dilihat pada Gambar 4.6



Gambar 4.6 Hasil uji difusi agar (a) Zona hambat bakteri P $10^{-5}1$ dengan *Bacillus pseudomycoides* (b) Zona hambat bakteri P $10^{-5}2$ dengan *Bacillus pseudomycoides* (c) Zona hambat bakteri P $10^{-7}1$ dengan *Bacillus pseudomycoides* (d) Zona hambat bakteri P $10^{-7}1$ dengan *Bacillus pseudomycoides* (e) Zona hambat bakteri P $10^{-5}1$ dengan *Corynebacterium ureicelerivorans*

Metode difusi agar yaitu metode cakram kertas dengan cara kertas cakram yang sudah direndam diletakkan diatas media padat yang ditumbuhi bakteri yang telah diinokulasi, setelah diinkubasi diatas media padat yang ditumbuhi bakteri yang telah diinokulasi, setelah diinkubasi kemudian diamati pembentukan zona hambatnya (Budianto *et al* 2015). Pada penelitian ini tiga isolat bakteri patogeng yaitu *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus firmus*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans* diuji dengan delapan isolat bakteri karang sehat. Hasil uji difusi agar didapatkan ada empat isolat bakteri simbion karang sehat aktif yang mempunyai potensi antibakteri yang dapat menghambat bakteri patogen *Bacillus pseudomycoides* dan *Corynebacterium ureicelerivorans* yaitu P10⁻⁵1 mampu menghambat bakteri patogen *Bacillus pseudomycoides* dan *Corynebacterium ureicelerivorans*, P10⁻⁵2 mampu menghambat *Bacillus pseudomycoides*, P10⁻⁷1 mampu menghambat bakteri *Bacillus pseudomycoides* dan P10⁻⁷ 2 mampu menghambat bakteri *Bacillus pseudomycoides*.

Budianto *et al* (2015) menjelaskan bahwa adanya aktivitas positif dapat ditunjukkan dengan luasan zona bening (zona hambat) disekeliling kertas cakram. Ngantung *et al* (2016) menjelaskan bahwa semakin lebar daya hambat (zona hambat) yang terbentuk menandakan semakin kuatnya senyawa bioaktif tersebut meghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini terlihat dari hasil uji aktivitas antibakteri seperti pada Gambar 4.6. Isolat karang sehat yang aktif kemudian dilakukan pengukuran pada area bening yang terbentuk disekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong dalam ukuran mm. Bagian yang diukur yaitu dari sisi sebelah kanan sampai dengan sisi sebelah kiri. Hasil pengukuran zona bening dapat dilihat pada Tabel 4.2

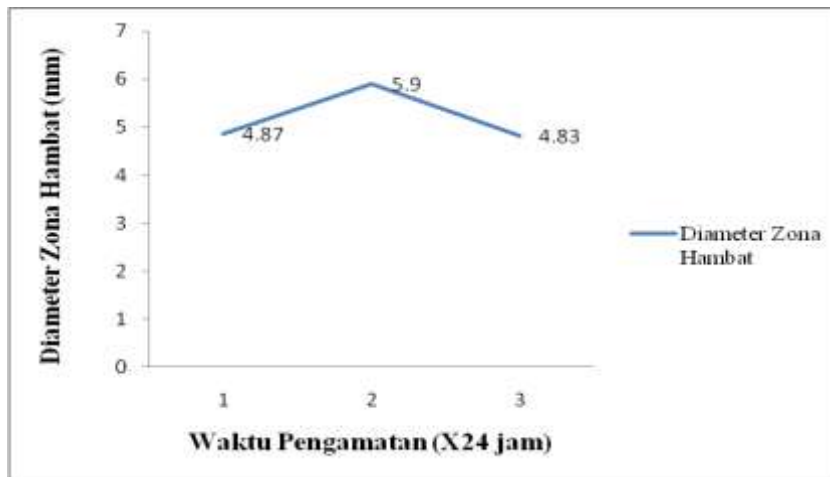
Tabel 4.2 Hasil Pengukuran Diameter Zona Bening

Isolasi bakteri karang uji	Hari ke (mm)			Rata-rata	Kekuatan antibakteri (David dan Stout 1971)
	1	2	3		
P10 ⁻⁵ 1 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	4,87 ± 0,1	5,90 ± 0,01	4,83 ± 0,01	5,19	Sedang
P10 ⁻⁵ 2 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	5,10 ± 0,02	5,50 ± 0,16	5,47 ± 0,16	5,36	Sedang
P10 ⁻⁷ 1 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	1,46 ± 0,13	2,63 ± 0,12	2,10 ± 0,13	2,063	Lemah
P10 ⁻⁷ 2 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	8,23 ± 0,05	8 ± 0,01	7,5 ± 0,04	7,91	Sedang
P10 ⁻⁵ 1 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	1,53 ± 0,11	1,43 ± 0,11	1,42 ± 0,11	1,30	Lemah
P10 ⁻⁵ 3 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵ 4 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 3 dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻¹⁰ dengan <i>Bacillus pseudomycooides</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 1 dengan <i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 2 dengan <i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 3 dengan <i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻¹⁰ 1 dengan <i>Bacillus firmus</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁵ 2 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁵ 3 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁵ 4 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 1 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 2 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻⁷ 3 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-
P10 ⁻¹⁰ 1 dengan <i>Corynebacterium ureicelerivorans</i>	-	-	-	-	-

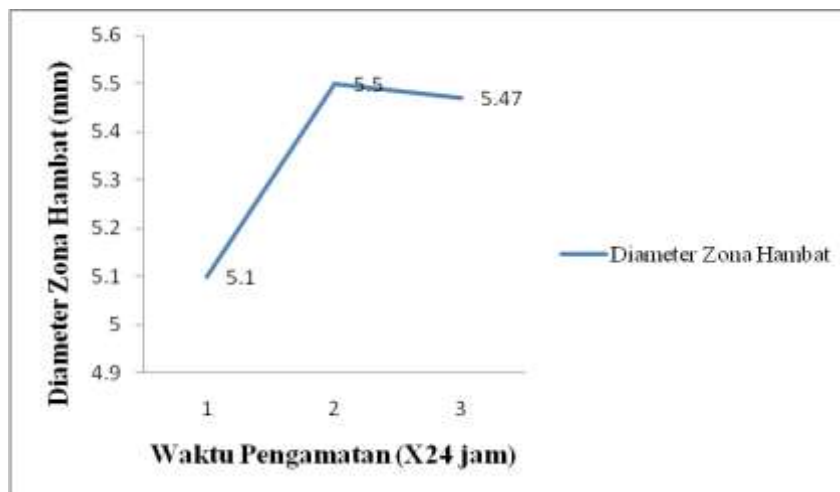
Keterangan : (±) Standard deviasi (-) Tidak ada zona hambat

Hasil pengukuran zona hambat yang dilakukan selama 3 kali pengukuran (3×24 jam) dapat dilihat pada Tabel 4.2. Dari delapan isolat bakteri karang sehat yang berasosiasi dengan karang *Porites attenuata* yaitu isolat P10⁻⁵1, P10⁻⁵2, P10⁻⁵3, P10⁻⁵4, P10⁻⁷1, P10⁻⁷2, P10⁻⁷3, P10⁻¹⁰1 diujikan dengan tiga isolat karang sakit yaitu *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus firmus*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans*, ada empat isolat bakteri yang aktif dan ada empat pula isolat bakteri yang tidak aktif. Empat isolat bakteri aktif yaitu isolat P10⁻⁵1, P10⁻⁵2, P10⁻⁷1, dan P10⁻⁷2 yang hanya mampu menghambat dua bakteri patogen yang diuji yaitu bakteri patogen *Bacillus pseudomycooides* dan *Corynebacterium ureicelerivorans*, sedangkan isolat yang tidak aktif yaitu isolat P10⁻⁵3, P10⁻⁵4, P10⁻⁷3, P10⁻¹⁰1 tidak dapat menghambat bakteri dari ketiga bakteri patogen yang diuji yaitu *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus firmus*, dan *Corynebacterium ureicelerivorans*.

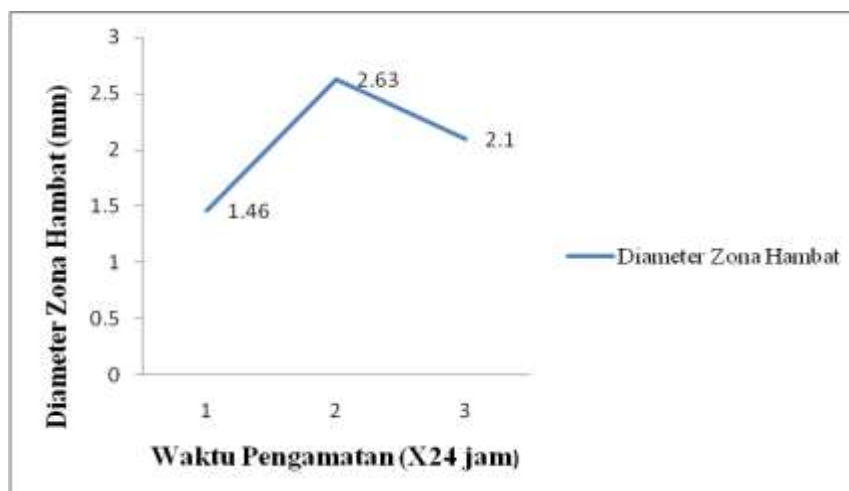
Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa Isolat P10⁻⁵1 diuji dengan *Bacillus pseudomycooides* memiliki nilai zona bening dengan rata-rata 5,19 mm kategori sedang, isolat P10⁻⁵2 diuji dengan *Bacillus pseudomycooides* memiliki nilai zona bening dengan rata-rata 5,36 mm kategori sedang, isolat P10⁻⁷1 diuji dengan *Bacillus pseudomycooides* memiliki nilai zona bening dengan nilai rata-rata 2,063 mm kategori lemah, isolat P10⁻⁷2 diuji dengan *Bacillus pseudomycooides* memiliki nilai zona bening dengan nilai rata-rata 7,91 mm kategori sedang, Isolat P10⁻⁵1 diuji dengan *Corynebacterium ureicelerivorans* memiliki nilai zona hambat dengan rata-rata 1,30 mm kategori lemah. Kekuatan zona hambat bakteri tersebut dikategorikan kekuatan daya hambatnya menurut David dan Stout (1971) yaitu zona hambat kategori sangat kuat dengan nilai >20 mm, zona hambat kategori kuat dengan nilai 10-20 mm, zona hambat kategori sedang nilai 5-10 mm, zona hambat kategori lemah dengan nilai <5mm.



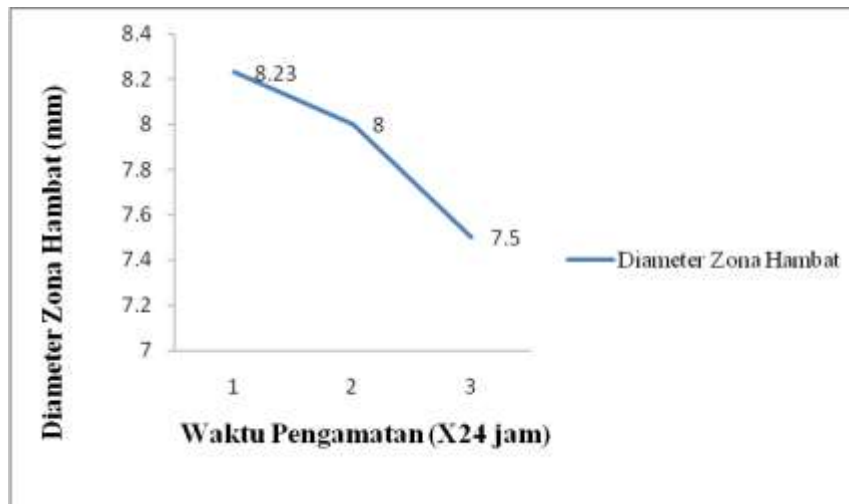
Gambar 4.7 Grafik diameter zona hambat $PI0^{-5}1$ dengan *Bacillus pseudomycolides*



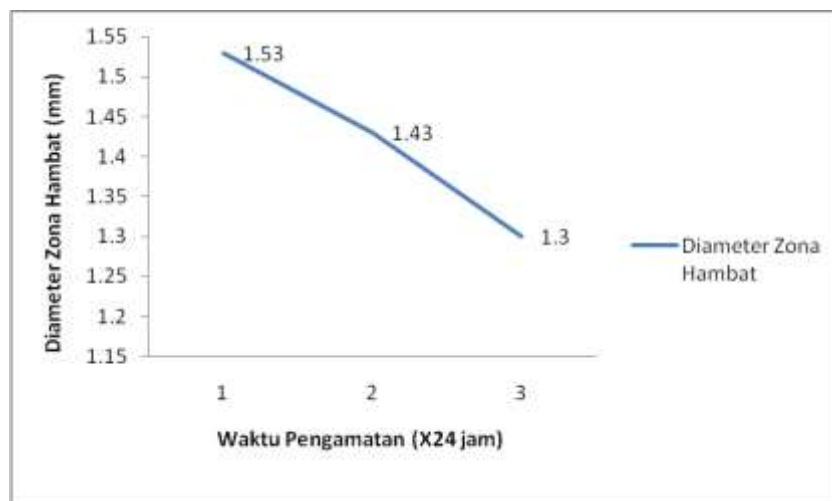
Gambar 4.8 Grafik diameter zona hambat $PI0^{-5}2$ dengan *Bacillus pseudomycolides*



Gambar 4.9 Grafik diameter zona hambat $PI0^{-7}1$ dengan *Bacillus pseudomycolides*



Gambar 4.10 Grafik diameter zona hambat $PI0^{-7}2$ dengan *Bacillus pseudomycolides*



Gambar 4.11 Grafik diameter zona hambat $PI0^{-5}2$ dengan *Corynebacterium ureicelerivorans*

Hasil diameter zona hambat Grafi 4.7 yaitu isolat $P10^{-5}1$ dengan *Bacillus pseudomycolides* pada hari pertama dengan waktu pengamatan 1×24 jam memiliki nilai diameter zona hambat sebesar 4,87 mm, pada hari kedua dengan pengamatn 2×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 5,90 mm sehingga terjadi kenaikan nilai zona hambat, sedangkan pada hari ketiga dengan pengamatan 3×24 jam memilii nilai zona hambat sebesar 4,83 mm sehingga terjadi penurunan nilai zona hambat. Hal ini diduga karena aktivitas antibakteri bersifat bakteriostatik.. Dewi dan Ima (2017) menjelaskan bakteriostatik bersifat menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan menurut Goering *et al* (2013) menjelaskan bahwa

bakteriostatik adalah sifat antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan bersifat sementara (*reversible*). Bakteri yang diduga bersifat bakteriostatik diperkuat oleh pernyataan Sucipto (2009) menjelaskan bahwa pertumbuhan bakteri rata-rata meningkat dari jam ke-0 samapi mencapai puncak pada jam ke-48 setelah itu mengalami penurunan.

Hasil diameter zona hambat pada Grafik 4.8 yaitu isolat $P10^{-5}2$ dengan *Bacillus pseudomycoides* pada hari pertama dengan waktu pengamatan 1×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 5,10 mm, pada hari kedua dengan pengamatan 2×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 5,50 sehingga terjadi kenaikan zona hambat, sedangkan pada hari ketiga dengan pengamatan 3×24 jam memiliki nilai zona hambat 5,47 mm sehingga terjadi penuruna nilai zona hamabat. Senyawa ntibakteri yang dihasilkan hanya bersifat bakteriostatik dimana hanya berpotensi menghambat bukan membunuh. Sedangkan hasil diameter zona hambat pada Grafik 4.9 yaitu isolat $P10^{-7}1$ dengan *Bacillus pseudomycoides* pada hari pertama dengan waktu pengamatan 1×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 1,46 mm, pada hari kedua dengan pengamatan 2×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 2,63 mm sehingga terjadi kenaikan nilai zona hambat, sedangkan pada hari ketiga dengan pengamatan 3×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 2,10 mm sehingga terjadi penurunan nilai zona hambat. Hal ini dapat dikatakan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan termasuk bakteriostatik. Namun kemampuan untuk menghambat bakteri masih lemah karena kekuatan nilai diameter zona hambat antibakteri kurang dari 5 mm.

Hasil diameter zona hambat pada Grafik 4.10 yaitu isolat $P10^{-7}2$ dengan *Bacillus pseudomycoides* pada hari pertama dengan waktu pengamatan 1×24 jam memiliki nilai diamter zona hambat sebesar 8,23 mm, pada hari kedua dengan pengamatan 2×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 8 mm sehingga terjadikenaikan zona hambat, sedangkan pada hari ketiga dengan pengamatan 3×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 7,5 mm sehingga terjadi penurunan nilai zona hambat. Hal ini diduga senyawa antibakteri yang dihasilkan bersifat bakteriostatik dengan kekuatan antibakteri kategori sedang (cukup) dalam menghmabat bakteri. Senyawa antibakteri yang dihasilkan hanya bersifat bakteriostatik dimana hanya berpotensi menghambat bukan membunuh. Hasil

diameter zona hambat pada Grafik 4.11 yaitu isolat $10^{-5}1$ dengan *Corynebacterium ureicelerivorans* pada hari pertama dengan waktu pengamatan 1×24 jam memiliki nilai diameter zona hambat sebesar 1,53 mm, pada hari kedua dengan pengamatan 2×24 jam memiliki nilai zona hambat sebesar 1,43 mm sehingga terjadi penurunan nilai zona hambat, sedangkan pada hari ketiga dengan pengamatan 3×24 jam memiliki nilai zona hambat 1,3 mm sehingga terjadi penurunan nilai zona hambat, kekuatan daya hambat bakteri tersebut tergolong masih lemah dalam menghambat bakteri. Dari empat isolat yang aktif mempunyai antibakteri, ada satu isolat yang mengandung senyawa antibakteri yang paling baik dari isolat yang lain yaitu isolat P1 ($P10^{-5}1$) karena ini isolat ini memiliki kemampuan menghambat dua bakteri patogen bakteri *Bacillus pseudomycoides*, dan bakteri *Corynebacterium ureicelerivorans*. Isolat bakteri yang memiliki antibakteri kemudian dilakukan perubahan kode isolat. Dari isolat $P10^{-5}1$ dirubah ke P1, $P10^{-5}2$ dirubah ke P2, $P10^{-7}1$ dirubah ke P3, dan $P10^{-7}2$ dirubah ke P4.

4.4 Amplifikasi 16s rDNA

Sampel DNA isolat bakteri yang telah di uji antibakteri kemudian dilakukan identifikasi molekuler yaitu di ekstraksi dan di amplifikasi dengan menggunakan metode Polymerase chain reaction (PCR) untuk mengamplifikasi gen 16s rDNA. Primer yang digunakan adalah primer universal. Wiguna *et al* (2016) menjelaskan bahwa untuk mengamplifikasi gen 16s rDNA primer universal untuk bakteri 27 F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik eubacteria 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT). Hasil dari proses ekstrasi dan amplifikasi untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian dari DNA. Hasil dari kemurnian DNA digunakan sebagai syarat untuk menunjukkan bahwa sampel target sudah bisa dilakukan analisa molekuler lebih lanjut begitupun sebaliknya. Hasil pembacaan kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 4.3

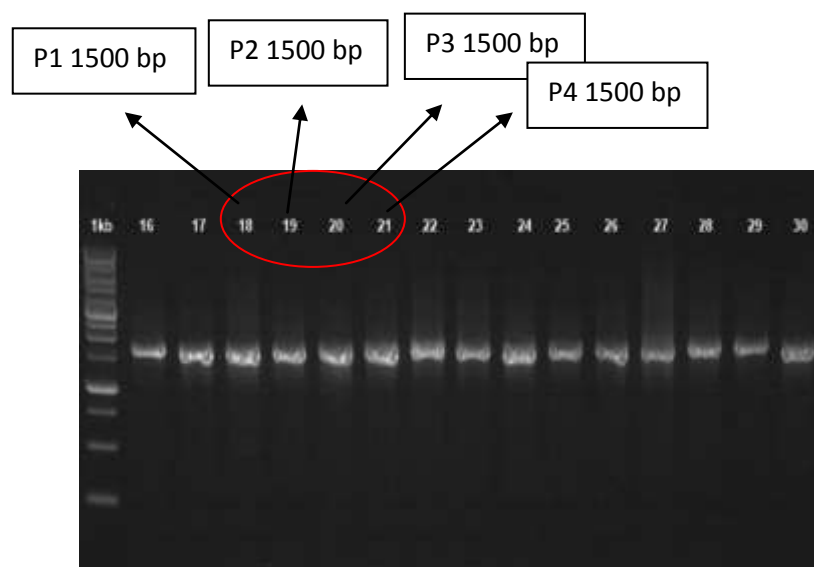
Tabel 4.3 Hasil pembacaan kemurnian DNA

No	Kode sampel	Konsentrasi DNA ng/μl	260/280 (Kemurnian DNA)
1.	P1 ($10^{-5}1$)	344,1	1,85
2.	P2 ($10^{-5}2$)	358,6	1,4
3.	P3 ($10^{-7}1$)	298,8	1,48
4.	P4 ($10^{-7}2$)	147,2	1,43

Ekstraksi yang baik didukung oleh hasil kuantitas DNA ekstrak yang diperoleh. Hasil dari kemurnian DNA sangat diperlukan agar dapat mengetahui derajat kontaminasi suatu sampel apakah sampel tersebut baik digunakan pada tahap selanjutnya. Oleh karena itu, dilakukan pengukuran terhadap kuantitas baik konsentrasi maupun kemurnian DNA genom. (Mustafa *et al* 2016). Nilai konsentrasi DNA pada Tabel 4.3 diatas cukup tinggi yaitu antara 147,2-344,1 ng/μl dengan nilai kemurnian yaitu antara 1,4 -1,8. Menurut Sambrook *et al* (1989) dalam Restu *et al* (2012) menjelaskan bahwa sampel DNA yang dianggap cukup murni mempunyai perbandingan $A_{260}/A_{280} = 1,80-2,0$, kisaran angka ini telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan dalam analisa molekuler. Sedangkan pada Tabel 4.3 ada 3 sampel dengan kode sampel P1 ($10^{-5}1$), P2 ($10^{-5}2$), P3 ($10^{-7}1$), dan P4 ($10^{-7}2$) memiliki nilai kemurnian <1,8. Konsentrasi yang tinggi serta nilai kemurnian kurang dari <1,8 berarti sampel hasil amplifikasi masih kurang murni dan masih terkontaminasi dengan protein maupun bahan lainnya. Sehingga dilakukan amplifikasi ulang, sebelum dilakukan amplifikasi terlebih dahulu melakukan pengenceran DNA. Pengenceran bertujuan untuk meminimalkan adanya kontaminasi seperti protein, fenol, maupun sisa bahan pada saat ekstraksi. Selain itu pengenceran dapat digunakan untuk menentukan volume akhir DNA pada komposisi Bahan PCR.

Hasil amplifikasi DNA dapat dilihat pada Gambar 4.7. Pada gambar tersebut menghasilkan semua isolat yang telah di amplifikasi menghasilkan singel band (pita tunggal). Hasil amplifikasi DNA dari isolat bakteri karang yang menghasilkan pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan merupakan primer yang spesifik untuk gen 16s rDNA pada bakteri. Sedangkan ukuran bp yang diperoleh yaitu berukuran 1500 bp sesuai dengan perbandingan

menggunakan marker DNA. Besarnya ukuran bp yang diperoleh sesuai dengan ukuran gen-gen 16S rDNA bakteri. Sesuai dengan pernyataan Radjasa dan ocky (2006) menyatakan bahwa hasil amplifikasi dari isolat bakteri yang memiliki hasil pita tunggal menunjukkan bahwa primer yang digunakan adalah primer yang spesifik untuk mengamplifikasi gen 16s rDNA pada bakteri, sedangkan besarnya ukuran bp dari gen-gen 16s rDNA bakteri yaitu antara 1500-1600 bp. Gambar 4.12 Hasil amplifikasi DNA-PCR single Band M. Marker ; (a) P1($10^{-5}1$) (b) P2 ($10^{-5}2$) (c) P3($10^{-7}1$) (d) P4 ($10^{-7}2$).



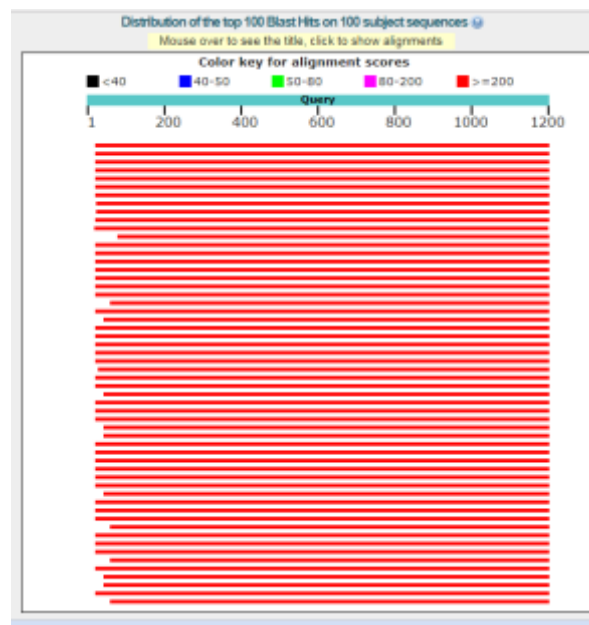
Gambar 4.12 Hasil amplifikasi DNA-PCR singel Band, M. Marker ; (a) P1($10^{-5}1$) (b) P2 ($10^{-5}2$) (c) P3($10^{-7}1$) (d) P4 ($10^{-7}2$)

4.5 Analisis Filogenetik Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang *Porites attenuata*

Hasil amplifikasi PCR 16s rDNA kemudian dilakukan analisa sekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Sekunsing DNA merupakan suatu teknik untuk menentukan urutan basa nukelotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal dengan sekuens DNA yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung intruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sebelum dilakukan analisis filogenetik dilakukan analisis BLAST (Basic Local Aligment Search) terlebih dahulu. Semua data sekuen sebelum dianalisa dilakukan blast (similarity) dengan data gen Bank

pada NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>). BLAST merupakan program yang banyak digunakan untuk mencari database protein dan DNA (Suyono 2010). Seperti yang dijelaskan oleh Altschul *et al* (1997) bahwa Program BLAST merupakan program yang banyak digunakan untuk mencari database protein dan DNA.

Tingkat homolog sekuen dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil BLAST. Nilai pada grafik yang berada dibawah angka 50 menunjukkan tingkat homolog kedua sekuen rendah yang dideskripsikan dengan warna hitam dan biru, warna hijau, merah muda, dan merah menunjukkan tingkat homolog yang semakin tinggi. Pada Gambar 4.8 Grafik hasil BLAST menunjukkan warna merah yang menandakan bahwa tingkat homolog sekuen tinggi.



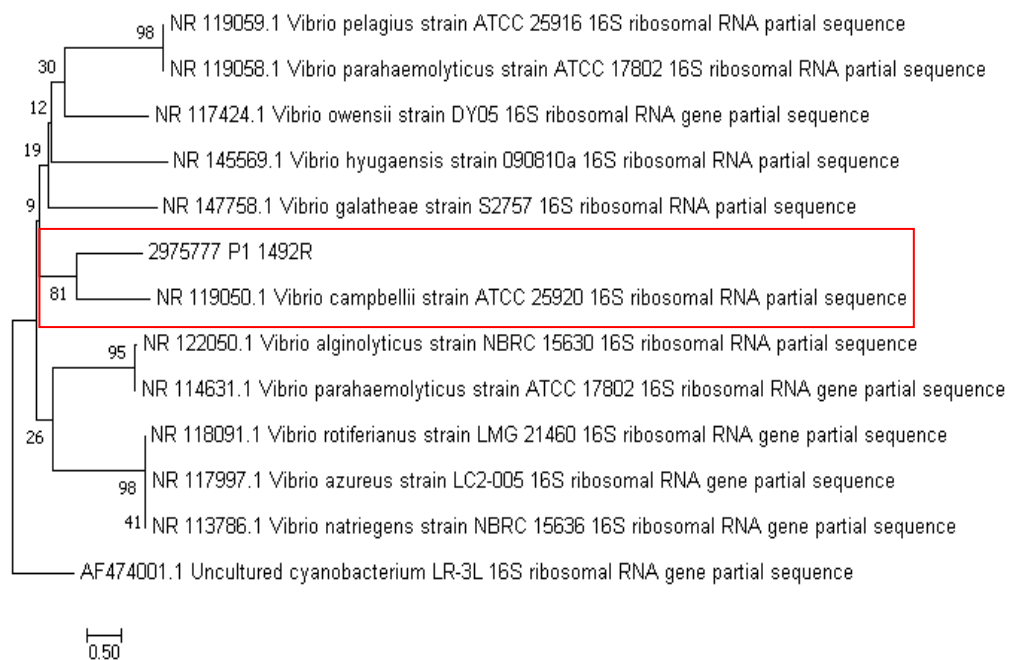
Gambar 4.13 Grafik hasil BLAST

Analisis hasil menggunakan BLAST diperoleh hasil isolat bakteri P1 ($P10^{-5}1$) yang berasosiasi pada karang sehat *Porites attenuata* memiliki homolog sebesar 92% dengan bakteri *Vibrio campbellii* (strain ATCC 25920), isolat P2 ($P10^{-5}2$) yang berasosiasi pada karang sehat *Porites attenuata* memiliki homolog 86% dengan bakteri *Bacillus licheniformis* (strain NBRC 12200), isolat P3 ($P10^{-7}1$) yang berasosiasi pada karang *Porites attenuata* memiliki homolog 99% dengan bakteri *Bacillus qingshengii* (strain G19), isolat P4 ($P10^{-7}2$) yang berasosiasi pada

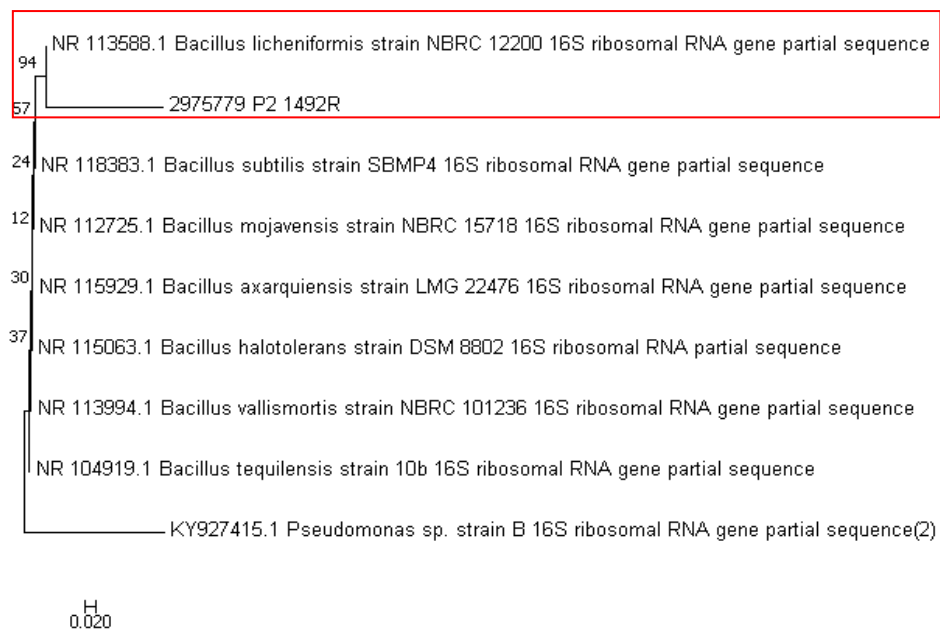
karang *Porites attenuata* memiliki homolog 75% dengan bakteri *Bacillus encelensis* (strain SGD-1123). Wiguna *et al* (2016) menjelaskan bahwa isolat yang mempunyai homolog sekuen 16S rDNA antara 93%-97% dapat mewakili identitas pada tingkat genus tetapi berbeda pada tingkat spesiesnya, sedangkan persamaan sekuen lebih dari 97% dapat mewakili spesies yang sama.

Analisis filogenetik merupakan analisa kelanjutan dari BLAST. Saitou dan Nei (1987) menjelaskan bahwa analisis filogeni menggunakan metode Neighbour-Joining dengan 1000 kali pengulangan pada program MEGA 7 yang digunakan untuk mengetahui posisi sampel penelitian. Mirabella (2012) menjelaskan bahwa analisa filogenetik merupakan analisa mengenai bagaimana keterhubungan organisme satu dan yang lainnya dilihat dari nenek moyang terakhir yang dimiliki bersama. Dimana pada nenek moyang tersebut terdapat sebuah sifat khusus baik secara morfologi ataupun molekuler yang masih dimiliki oleh dua atau lebih organisme tersebut. Melalui filogenetik, dapat diamati lebih jelas bagaimana evolusi dapat terjadi, bahkan bagaimana alur evolusi itu terjadi pada makhluk hidup. Bagaimana kedekatan makhluk hidup yang satu dengan yang lainnya, bagaimana terjadinya perubahan dari satu organisme satu dengan organisme lainnya dapat dilihat melalui pendekatan dengan filogenetik ini.

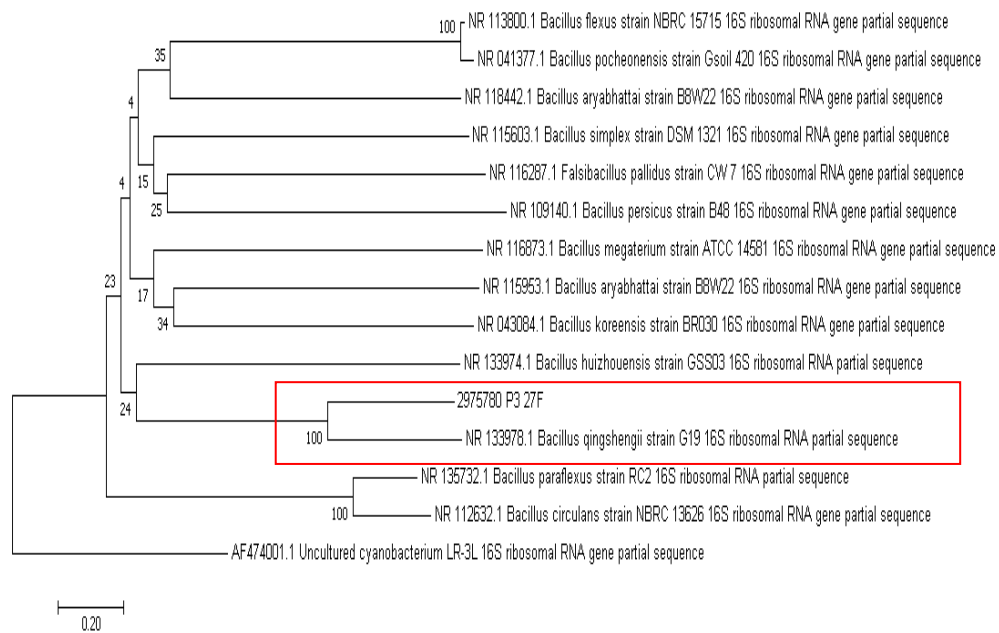
Triana (2005) menjelaskan bahwa analisis 16s rDNA berguna untuk melihat hubungan antara spesies pada banyak kelompok bakteri. Salah satu cara untuk melihat hubungan tersebut dengan menggunakan pohon filogenetik dengan menggunakan program MEGA 7. Analisis pohon filogeni digunakan karena dapat menggambarkan kekerabatan yang tepat antara organisme. (Li dan Graur 1991 dalam Wirdateti *et al* 2016). Hasil filogenetik dapat dilihat pada Gambar 4.14, 4.15, 4.16, dan 4.17



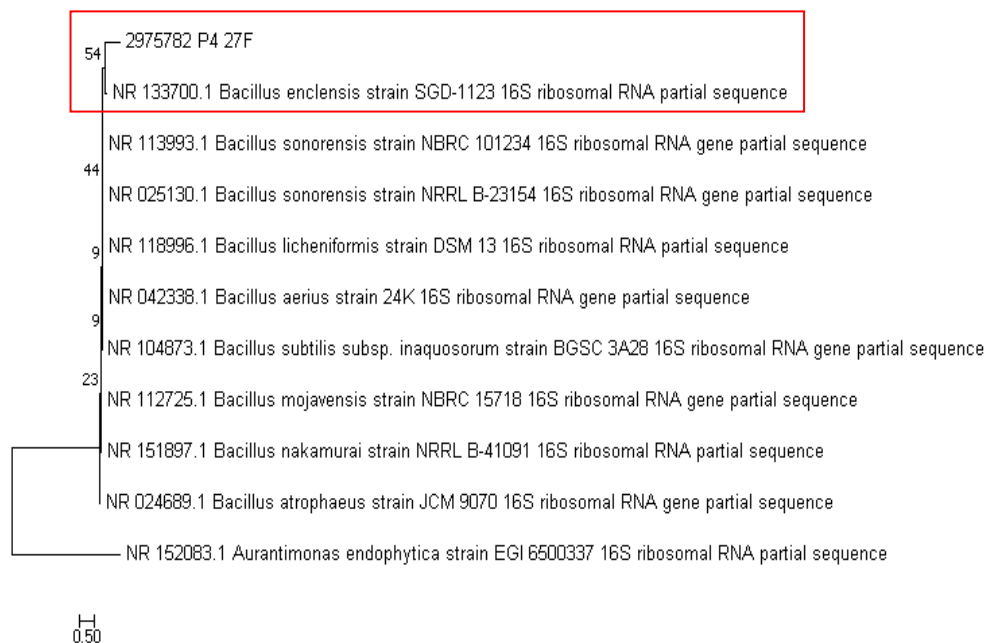
Gambar 4.14 Pohon filogenetik isoat P1 yang berasosiasi pada *Porites attenuata*



Gambar 4.15 Pohon filogenetik isolat P2 yang berasosiasi pada *Porites attenuata*



Gambar 4.16 Pohon filogenetik isolat P3 yang berasosiasi pada *Porites attenuate*



Gambar 4.17 Pohon filogenetik isolat P4 yang berasosiasi pada *Porites attenuata*

Hasil analisis filogenetik pada Gambar 4.14 menunjukkan bahwa isolat P1 identik dengan bakteri *Vibrio campbellii* dengan nilai bootstrap 81%. Gambar 4.15 menunjukkan bahwa bakteri isolat P2 identik dengan bakteri *Bacillus licheniformis* dengan nilai bootstrap 94%. Gambar 4.16 menunjukkan bahwa bakteri isolat P3 identik dengan bakteri *Bacillus qingshengii* dengan nilai

bootstrap 100%. Gambar 4.17 menunjukkan bahwa bakteri isolat P4 memiliki identik dengan bakteri *Bacillus encelensis* dengan nilai bootstrap 54%.

Nilai bootstrap pada bakteri isolat P1 termasuk dalam kategori cukup stabil (cukup akurat) karena berada pada nilai bootstrap 81%, nilai bootstrap pada bakteri isolat P2 termasuk dalam kategori cukup stabil (cukup akurat) karena berada pada nilai bootstrap 94%, nilai bootstrap pada bakteri P3 termasuk dalam kategori sangat stabil (sangat akurat) karena pada nilai bootstrap 100%, nilai bootstrap P4 termasuk dalam kategori kurang stabil (kurang akurat) karena berada pada nilai bootstrap 54%. Pernyataan ini di dukung oleh pernyataan Horiike *et al* (2009) menjelaskan bahwa nilai bootstrap 95% atau >95% mempunyai arti bahwa topologi percabangan tersebut sangat akurat, konsisten atau tidak akan berubah walaupun dilakukan dengan metode penyusunan pohon filogenetik lainnya. Sedangkan menurut Coenye dan Vandamme (2003) menjelaskan bahwa nilai bootstrap diatas 70% sampai dengan 94% mempunyai arti tipologi percabangan tersebut cukup akurat (signifikan) dan tetap, sedangkan untuk nilai bootstrap dibawah 70% dikatakan tidak akurat (tidak stabil).

4.6 Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Sehat *Porites attenuata*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat *Porites attenuata* adalah *Vibrio campbellii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus qingshengii*, *Bacillus encelensis*. Bakteri *Vibrio* merupakan bakteri yang berperan penting dalam siklus nutrien perairan melalui pemecahan bahan organik (Thompson *et al* 2004). Bakteri *Vibrio* juga menyediakan asam lemak tak jenuh esensial bagi rantai makanan akuatik (Nichols 2003). Selain itu bakteri *Vibrio* juga dapat mendegradasi kitin, sebuah homopolimer N-asetil glukosamin yang merupakan salah satu pool terbesar gula amini di lautan (Riemann dan Azam 2002). Menurut Thompson *et al* (2004) menjelaskan bahwa spesies tertentu dari bakteri *Vibrio* ini digunakan untuk produksi vaksin dan probiotik dan dapat melakukan bioremediasi hidrokarbon poliaromatik. Bakteri *vibrio* merupakan bakteri akuatik yang sering ditemukan di sungai, muara sungai, kolam, dan laut. (Liston 1989). Secara umum bakteri *Vibrio* bersifat aerob, tetapi adapula yang bersifat anearob fakultatif dan juga adapula yang bersifat motil karena

pergerakannya. *Vibrio* dapat berperan sebagai bakteri patogen primer dan patogen sekunder. Sebagai patogen primer *vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme, sedangkan sebagai patogen sekunder *vibrio* menginfeksi organisme yang telah terinfeksi lebih dahulu oleh organisme lain. Bakteri *vibrio* merupakan bakteri patogen penyebab *vibriosis* pada ikan budidaya kerapu (Notowinarto dan Fenny 2015).

Bakteri *Vibrio* merupakan bakteri patogen penyebab *vibriosis* pada ikan budidaya kerapu. Salah satu spesiesnya adalah *Vibrio campbellii* (Nitimulyo et al 2005). Bakteri *Vibrio campbellii* merupakan salah satu bakteri genus *Vibrio* yang tergolong spesies baru dan pemanfaatan bakteri asal laut ini masih sangat terbatas. Meskipun bakteri ini termasuk bakteri patogen tapi bakteri ini memiliki zat antibakteri yang terkandung didalamnya, terbukti dalam penelitian yang telah dilakukan bahwa bakteri tersebut mengandung antibakteri. Penelitian ini didukung oleh penelitian yang sudah dilakukan oleh Lubis (2015), dalam penelitiannya menghasilkan bakteri patogen jenis *Vibrio sp* memiliki aktivitas antibakteri. Sehingga dengan zat aktif ini bisa dimanfaatkan untuk mencegah ataupun menghambat penyakit yang menyerang terumbu karang ataupun organisme laut lainnya. Lubis (2015) menjelaskan bahwa kemampuan bakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroba uji dalam interaksi antagonis menegaskan bahwa isolat tersebut memiliki senyawa kimia yang dikeluarkan sebagai sistem pertahanan dalam kompetensi untuk mendapatkan ruang dan nutrisi yang tersedia dalam lingkungan kecil.

Bacillus licheniformis merupakan bakteri yang hidup di laut serta dapat pula ditemukan di tanah. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hiram et al (2014) tentang bioaktivitas bakteri *Bacillus licheniformis* menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus licheniformis* memiliki antibakteri yang dapat menghambat bakteri patogen pada manusia yaitu *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa*. Soeka et al (2001) menjelaskan *Bacillus licheniformis* juga mengandung aktivitas enzim amilase. Enzim amilase digunakan sebagai bahan aditif biodeterjen. Enzim dari sumber bakteri telah banyak di aplikasikan dalam sektor industri terutama industri biodeterjen. Penambahan enzim pada biodeterjen dapat meningkatkan kemampuan

untuk membersihkan noda yang sulit hilang. Penggunaan enzim dalam biodeterjen dapat mengurangi pencemaran lingkungan.

Bacillus qingshengii merupakan bakteri gram positif, penghasil endospora, aerobik, non motil dan berbentuk batang. Kisaran suhu untuk pertumbuhannya adalah 4-45°C dengan suhu optimum 30°C. Kisaran pH untuk pertumbuhan adalah 4-8 dan pH optimum adalah 7. Memiliki koloni yang melingkar dan berpigmen dengan diameter koloni 5 µm (Xi *et al* 2014). (Xi *et al* 2014) menjelaskan bahwa bakteri *Bacillus qingshengii* merupakan spesies baru dari genus *Bacillus* dengan strain G19. Bakteri ini merupakan bakteri pembentuk karang yang sudah di isolasi dari permukaan batuan yang lapuk. Sedangkan bakteri *Bacillus encelensis* merupakan bakteri yang biasanya hidup di tanah, alga, dan laut. *Bacillus encelensis* merupakan bakteri gram positif, motil dengan flagellum polar tunggal. Memiliki koloni halus, bundar sedikit tak beraturan, berwarna kuning, kuning pucat, dengan ukuran diameter 2-3 µm (Dastager *et al* 2016).

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Terdapat 4 isolat bakteri karang sehat yang memiliki aktivitas yang berpotensi sebagai antibakteri yang dapat menghambat bakteri patogen yang berasosiasi dengan karang *Porites sp* yang terserang white plague yaitu isolat P1 dengan kategori sedang dan lemah, isolat P2 dengan kategori sedang, isolat P3 dengan kategori lemah, dan P4 dengan kategori sedang.
2. Hasil filogenetik menunjukkan bahwa isolat P1 identik dengan bakteri *Vibrio campbellii*, isolat P2 identik dengan bakteri *Bacillus licheniformis*, isolat P3 identik dengan bakteri *Bacillus qingshengii*, isolat P4 identik dengan bakteri *Bacillus encelensis*.

5.2 Saran

Diharapkan dapat dilakukan penelitian lanjutan yaitu uji biokimia untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa yang terdapat pada bakteri yang diuji.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, M.Z. 2015. *Perbandingan Presentase Tutupan Terumbu Karang Hidup Pulau Gili Rajeh dan Gili Labak Kabupaten Sumenep Madura*. Skripsi. Universitas Trunojoyo Madura.
- Altscul, S.F., Thomas, L.M., Alejandro, A.S., Jinghung, Z., Zheng, Z., Webb, M. dan David, J.L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new gwnwration of protein data base search programs. *Nucleic Acids Reseasrch*. 25(17): 3389-3402.
- Annisa.2012. *Isolasi RNA dan Pengklonaan GEN Tripsin Kation dari Pangkreas Sapi ke Escherichia coli DH5α*. Depok : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi.
- Arisandi,A., Badrul, T., Raini, Y. 2017. Jumlah Koloni Pada Media Kultur Bakteri Yang Berasal Dari Thallus Dan Perairan Sentra Budidaya *Kappaphycus Alvarezii* Di Sumenep. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*.Vol 9(1).
- Astutiningrum, T. 2016. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus Kunth) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aerus Secara In-vitro*. Skripsi. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Sanata Dharma.
- Aryulina, D. 2005. *Biologi I*. Jakarta : Erlangga. 134 hal.
- Budianto., Arief, P., Ating, Y. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Buah Adas (*Foeniculum vulgare*, Mili) Pada *Vibrio harveyi* dan *Vibrio alginotycus*. *Agritech*. Vol 35 (3).
- Coenye, T., Vandamme, P. 2003. Extracting Phylogenetic Information From Whole Genome Squencing Projects: The Lactic Acid Bacteria a Test Case. *Microbiology*. 149 :3507-3517.
- Dahrmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*. 21(1): 1-10.
- Dahuri, R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut Asset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. halaman 29-30
- Dastanger, S, G., Rahul, M., Shan, K, T., Krishnamurthi, S.,V, Venkata, R., Yogesh, S, S. 2014. *Bacillus enclencis* sp Nov., Isolated From Sediment sample. *Antonie van Leeuwenhock*. 105: 199-206.
- Davis., Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbioligical Antibiotic Essaay. *Journal of Microbiology*. Vol 22 (4).
- Dewi, S, E, N., Ima,W. 2017. Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) Terhadap Bakteri Sthphilococcus aureus Dan Escherichia coli. *Saintek Perikan*. Vol 13(1):1-6.

- Dwiyatno.2008. *The optimazion and validation of a Polymerasi Chain Reaction protocol for fish and seafood authenticity based on the cytochromo b gne.* (Tesis).
- Fardiaz, S. 1998. *Mikrobiology Pangan.* Bogor. PAU Pangan dan Gizi. Bogor. IPB. 125 hal.
- Fery,K.,Robba, F., Irfanuddin, R. 2017. Kebutuhan Pengelolaan Wisata di Pulau Gili Labak, Sumenep: Euforia Destinasi Wisata baru. *Coastal and Ocean.* Vol 1(2).
- Fitri, L., Yekki, Y. 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi Edukasi.* Vol 3 (2) : 20-25.
- Giyanto., Muhammad, A., Tri, A, H., Agus, B., Muhammad, H., Abdullah, S., Marindah, Y, I. 2017. *Status Terumbu Karang Indonesia.* Jakarta. Pusat Penelitian Oseanografi. LIPI.
- Goering, R., Hazel, D., Mark, Z., Ivan, R., Peter, L, C. 2013. *Mims' Medical Microbiology.* Fifth Edition. Elsvier Ltd.
- Gzimerk, B. 1976. *Gzimer'ks Animals Life Enclopedia.* Van Norston Reinhold Company. New York. Vol 1.
- Handoko, A. 2017. *Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Penyakit White Band Pada Acropora formosa Di Pulau Gili Labek Kabupaten Sumenep.* Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Trunojoyo Madura.
- Hatmanti, A. 2000. *Pengenalan Bacillus spp. Oseana,* Vol XXV (1):31-41.
- Hirad, A, H., Ali, H, B., Mohamed, A, K., Arif, A, M., Chandra, M, S., Abdallah, M, E., Basheer, A, A, S. 2014. Bioactivity of Marine *Bacillus Licheniformis* Ksawd3 Isolated From Arabian Gulf, Saudi Arabia. *Jornal Of Pure and Applied Microbiology.* Vol 8(1): 607-613.
- Hockat, K, L., David, A, B. 2017. Usage of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *Journal List J Vis. Exp* (119).
- Horiike, T., Daisuke, M., Kazuo, H., Satosi, S., Takao, S., Sudhir, K., Ranajit, C., Tomoyoshi, K., Yoshio, T. 2009. Phylogenetic Construction Of 17 Bacterial Phyla by New Method and Carefully Selected Orthologs. *Gene.* 429: 59-64.
- Hutching, P., Sanenger, P. 1987. *Ecology of Mangrove Aus.Eco.* Series. University of Queensland Press St Lucia. Quesland
- Handoyo, D., Ari, R. 2001. Prinsip umum dan pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR) (General Principles and implementation of plymerase chan reaction). *Unitas.* Vol 9:17-29.
- Irawan, D. 2016. *Identifikasi jenis dan prevalensinya penyakit karang di pulau gili labek kecamatan talango kabupaten sumenep.* Skripsi. Program Studi Ilmu Kelautan. Fakultas Pertanian. Universitas Trunojoyo Madura.

- Jailani, I. 2014. *Bakteri Asosiasi Pada Karang Pachyseris sp Yang Terinfeksi Penyakit BBD (Black Band Disease) di Perairan Pulau Barrang Lompo*. Makassar. Universitas Hasanuddin. Skripsi.
- Kurniawan, F., Robba, F. D., Irfanudin, R. 2017. Kebutuhan Pengelolaan Wisata di Pulau Gili Labak, Sumenep : Euforia Destinasi Wisata Baru. *Coastal and Ocean Journal*. Vol 1(2) : 7-15.
- Lay B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 167 hlm.
- Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. 2016. Inilah Status Terumbu Karang Indonesia Terkini. (Online). <http://lipi.go.id/berita/inilah-status-terumbu-karang-indonesia-terkini/15024>. Diakses tanggal 24 Juli 2017.
- Liston, J. 1957. The Occurrence and Distribution of Bacterial Types on Flatfish. *J. gen. Microbiol.* 16 (205-216).
- Lubis, S, S. 2015. Penapisan Bakteri Laut Penghasil Antimikroba dari Pesisir Serdang Bedagai Sumatera Utara. *Journal of Islamic Science and Technology*. Vol 1 (1).
- Massiana, A., Akbar, T., Jamaluddin, J., Alexander, R. 2017. Bakteri Asosiasi di Karang Batu (*Skleractinian*) yang Terinfeksi Penyakit Tumor (*Growth Anomalies*) yang Berasosiasi dari Pulau Salemo Kabupaten Pngkep. *SPERMONDE*. 3 (1):7-12.
- Mirabella, F. M. 2012. *Pendekatan Pohon dalam Filogenetik*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Munshi, A. 2012. *DNA Sequencing-Methods and Application*. Janeza Trdine , 51000 Rijeka. Croatia.
- Murniasih, T. 2005. Substansi Kimia untuk Pertahanan Diri dari Hewan Laut tak Bertulang Belakang. *Oseana*. 30 (2) : 19-27.
- Mustafa, H., Indra, R., Yusran, U. 2016. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Genom Nyamuk *Anopheles barbirostris*. *Jurnal Vektor Penyakit*. Vol 10 (1):7-10.
- Ngantung, A, E, C., Deiske, A, S., Robert, A, B. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri dari Spons *Dictyonella funicularis* dan *Phyllospongia lamellosa* yang diambil pada Perairan Bunaken. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. Vol 2 (1).
- Nichols, D, S. 2003. Prokariotes and The Input of Polysaturated Fatty Acid to The Marine Food Web. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:1-7.
- Nitimulyo, K, H., Alim, I., Triyanto. 2005. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi *Vibrio spp* Patogen Penyebab Vibriosis Pada Kerapu Di Balai Budidaya Air Payau Situbondo. *Jurnal Perikanan*. VII (2) :80-94.
- Notowinarto., Fenny, A. 2015. Populasi Bakteri *Heterotrof* di Perairan Pulau Bulang Batam. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*. Vol 1 (3):334-342.

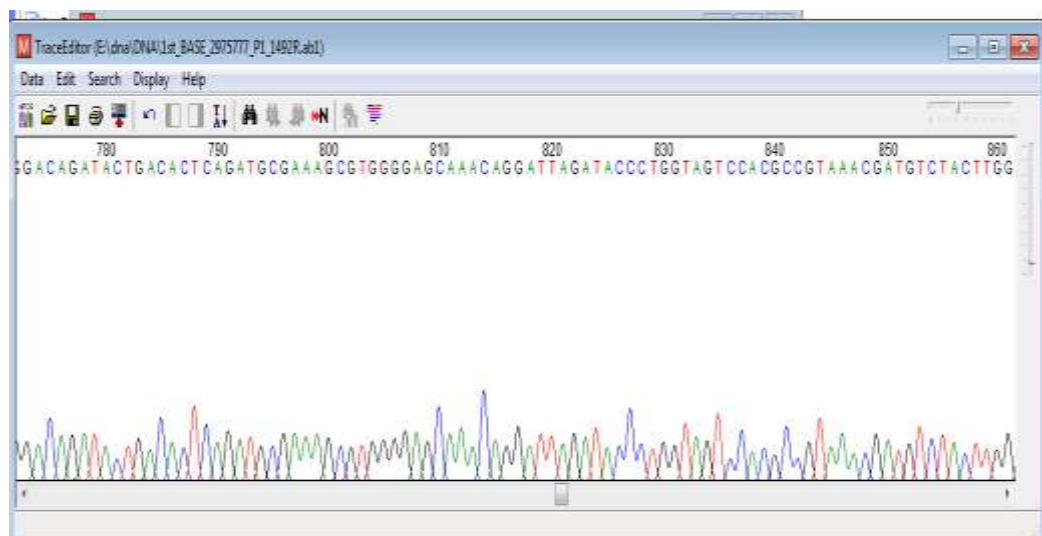
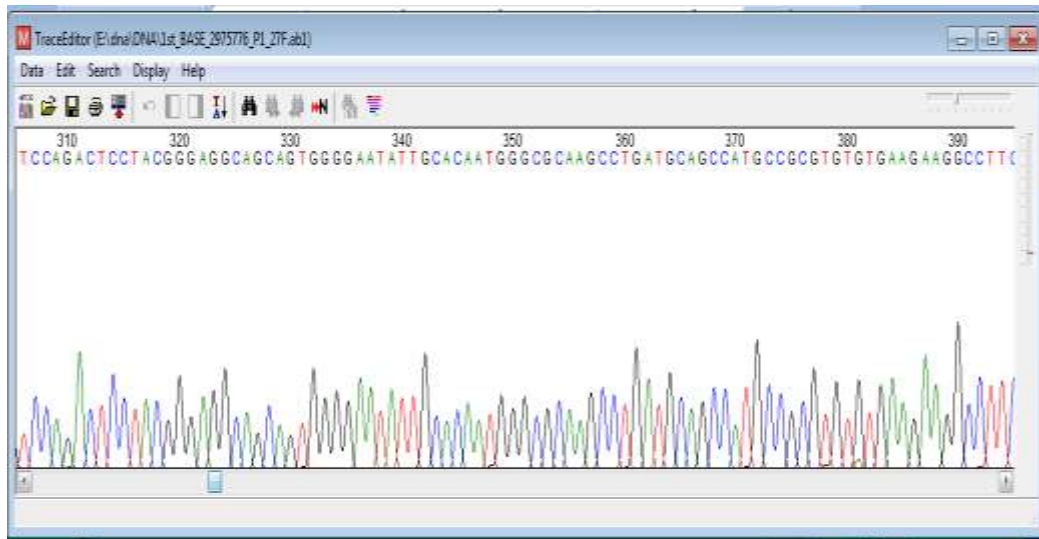
- Nugues, M, M., 2002. Impact Of A Coral Diase Outbreak On Coral Communities In St. Lucia: What And How Much Has Been Lost ?. Marine Ecology Progress Series. Vol 229:61-71.
- Nybakken, J, W. 1988. *Biologi Laut : Suatu Pendekatan Ekologis*. Jakarta : Gramedia
- Pamungkas, Y, P., Agus, S., Diah, P, W., 2014. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Karang Terhadap Bakteri Yang di Isolasi Dari Karang Terserang Penyakit Ulcerative White Spots di Perairan Pulau Panjang, Jepara. *Journal Of Marine Research*. Volume 3 (3): 254-264.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. penerjemah : Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: Elements of Microbiology.
- Pelczar, M, J., Chan, E, C, S. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi 2, Alih bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S. dan Angka, S. L., UI Press, Jakarta.
- Pertiwi, Ni, Putu, Dian., Mahardika,IG,N., Ni, Luh, Watniasih. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Pada Ikan Karang Anggota *Pseudochromidae* (*Dottyback*) Untuk Identifikasi Spesies Secara Molekuler. *Jurnal Biologi*. 19(2):1-5.
- Rahmi. 2014. Prevalensi Penyakit Karang di Kawasan Konservasi Laut Daerah di Sulawesi Selatan. *Jurnal ilmu perikanan*. Vol 3(2).
- Restu, M., Mukrimin dan Gusmiati. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (Toona Sureni Merr.) Untuk Analisis Keragaman Genetik Berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Natur Indonesia*. 14(2): 138-142.
- Richardson, L,L 1998. Coral Disease ; What is Realy Known Trends in kology and Evolution. 13:438 -443.
- Richardson, LL., Miller, AW., Broderick, E., Kaczmarsky, L., Gantar, M., Stani'cl, D., Sekar, R., 2009. Sulfide, microcystin and the etiology of Black Band Disease. *Disease of aquatic organisms* Vol. 87: 79-90.
- Riemann, L., Azam, F. 2002. Wdespread N-Acetyl-D-Glucosamine Uptake Among Pelagic Marine Bacterial and Its Ecological Implications. *Microbiology*. Vol 68 (11).
- Rizaldi, R. 2016. *Isolasi dan Karakteristik Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun Enhalus acoroides di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur*. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Rizka, A.2103. *Skrining bakteri simbion spons asal perairan pulau polewali dan pulau sarappolompo sebagai penghasil antibakteri terhadap bakteri patogen pada manusia dan ikan*. skripsi. fakultas ilmu kelautan dan perikanan universitas hasanuddin makassar.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef ,L., Efrony,R., Zilber-Rosenberg I,. 2007. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol*. 5:355–362.

- Sabdon, A. 2008. *Patologi Karang*. Badan Penerbit Universitas Diponegoro Semarang, 98 hlm.
- Sabdon, A., Ocky, K, R., 2006. Karakteristik Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (Black Band Disease) Pada Karang *Acropora* sp di Perairan Karimun Jawa. *Ilmu Kelautan*. Vol 11 (3): 158-162.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The Neighbour Joining Method: A New Method For Reconstructing *Phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Sarbini, K. 2012. *Biodegradasi Pyrena Menggunakan Bacillus Subtilis C19*. Program Studi Teknologi Bioproses. Fakultas Teknik. Departemen Teknik Kimia. Depok.
- Sheppard, A., Fenner, D., Edward, A., Abrar, M., Ochavillo, D.2008. *Porites attenuata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e. T133107A3567265.
<http://dx.doi.org/10.2035/IUCN.UK.2008.RLTS.T133107A3567265.en>.
- Sidharta, B, R. 2000. Pengantar Mikrobiologi kelautan. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- Siringoringo, R, M. 2007. Pemutihan Karang dan Beberapa Penyakit Karang. *Oseana*. volume 32 (4): 29- 37.
- Soekardjo, B. dan Siswandono, 2000, *Kimia Medisinal, Edisi ke-2*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Soeka, Y, S. 2015. Kemampuan *Bacillus Licheniformis* dalam Menghasilkn Enzim α -Amilase. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 1(5) : 1162-1166.
- Soeka, Y, S., Sri, H, R., Ninu, S., Elidar, N. 2011. Kemampuan *Baccillus Licheniformis* Dalam Memproduksi Enzim Protease Yang Bersifat Alkalin dan Termofilik. *Media Libang Kesehatan*. Vol 21 (2).
- Soenardjo,N. 2013. Karakterisasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit PinkBlotchdi P. Sambangan, Karimunjawa. *Buletin Oseanografi Marina*
- Suharsono. 2008. *Jenis-jenis Karang di Indonesia*. Jakarta.
- Sucipto, I. 2009. Biogas Hasil Permentasi Hidrolisat Bagas Menggunakan Konsorsium Bakteri Termofilik Kotoran Sapi. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Suyono, Y. 2010. Penentuan Spesies Bakteri *Pseudomonas* dan Analisis *Phylogenetic Tree* Secara Bioinformatika. *Biopropal Industri*. Vol 1 (2).
- Thacker,C.E. 2003. Molecular Phylogeny Of The Gobioid Fishes (*Teleostei: Perciformes: Gobioidei*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26:354-368.
- Thompson, F, L., Ida, T., Swings, J. 2004. *Biodiversitas of Vibrio s. Microbiology and Biology Rev*. 68(3):403-431.

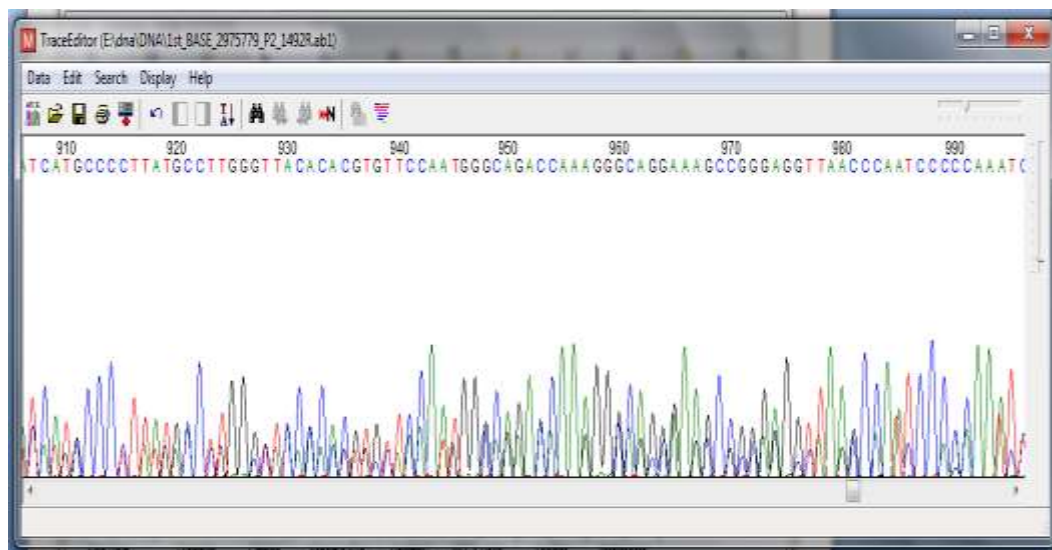
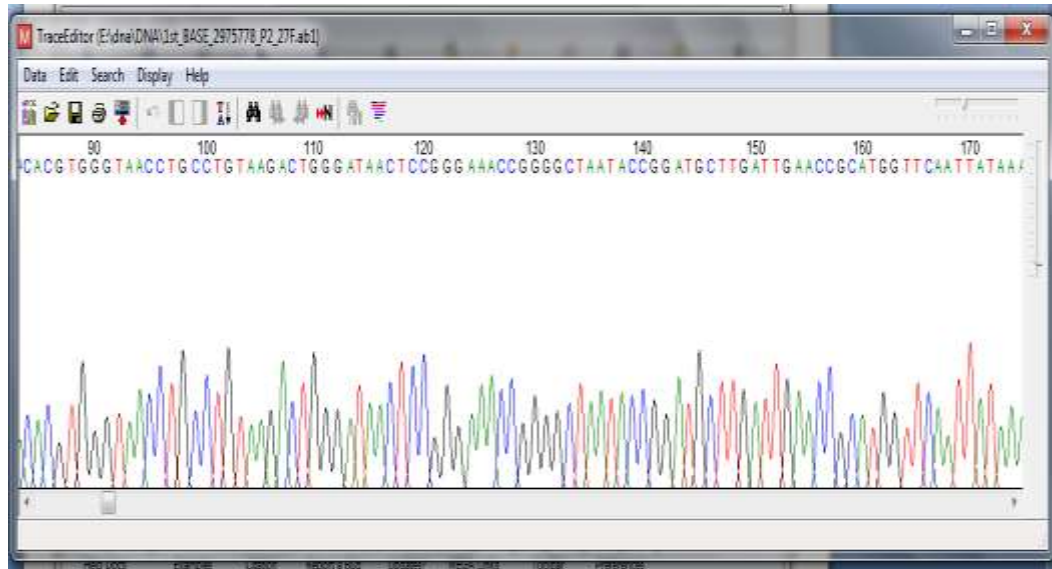
- Toy, T, S, S., Benedictus, S, L., Bernat, S, P, H. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Rumput Laut *Gracilaria* sp Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aerus*. *Jurnal e-GiGi (eG)*. Vol 3 (1).
- Triana, E. 2005. Analisis Filogenetik Rhizobia yang Diisolasi dari *Aeschynomene* spp. *Biodiversitas*. Vol 6 (4):233-237.
- Tshikhudo, P., Ronald, N., Khayaletu, N. dan Fhatuwani, M. 2013. Bacterial Species Identification Getting Easier. *African Journal of Biotechnology*. 12(41): 5976-5982. ISSN 1684-5315.
- Usman, W, S. 2015. Bakteri Asosiasi Karang Yang Terinfeksi Penyakit Brown Band (Brb) Di Perairan Pulau Barrang Lompo Kota Makassar. Skripsi. Jurusan Ilmu Kelautan. Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Veron, J. 2000. Coral of The World Volume Volume 1,2,3. Australian Institute of Marine Science. Australia and CRR Id Pty Ltd. Australia and the Indopacifik. Angus Robertson Publish, Australia.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*. 54(3):134-139.
- Weil, E., Garriet, S, Diego, L., Gil, A. 2006. Status and progress in coral reef disease research. *Diseases Of Aquatic Organism*. Vol 69: 1–7.
- Wiguna, A, S., Lia, K., Ocky, K, R. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Pigmen Karotenoid Dari Isolat Bakteri Symbion Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aerus* ATCC. *IJPST*. Vol 3 (3).
- Willis, B.L., Page, C.A., Dinsdale, E, A. 2004. *Coral Disease on the Great Barrier Reef In: Rosenberg E, Loya Y (eds) Coral Disease and Health*. pp 69-10
- Wood, E.M., 1983. *Reefs Coral of the World. Biology and Field Guide*. T.F.H. Publications, Inc., Ltd. Neptune City. 256p.
- Xi, J., Lin, Y, H., Zhi, H., Xi, F, S. 2014. *Bacillus qingshengii* sp. Nov a Rock Weathering Bacterium Isolated From Weathered Rock Surface. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 :2473-2479.
- Yusuf, Z, K. 2010. Polymerase Chain Reaction. *Saintek*. 5(6):1-6.
- Zvuloni, A., Yael, A, R., Guy, K., Yossi, L., Lewi, S. 2015. *Modeling the Impact of White-Plague Coral Disease in Climate Change Scenarios*. *Computational Biology*. DOI:10.1371.

LAMPIRAN

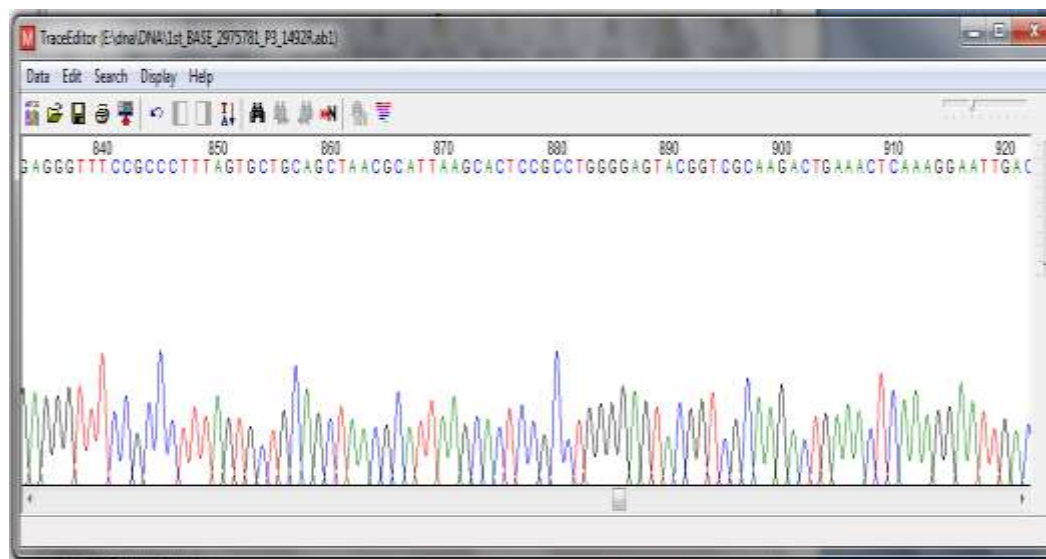
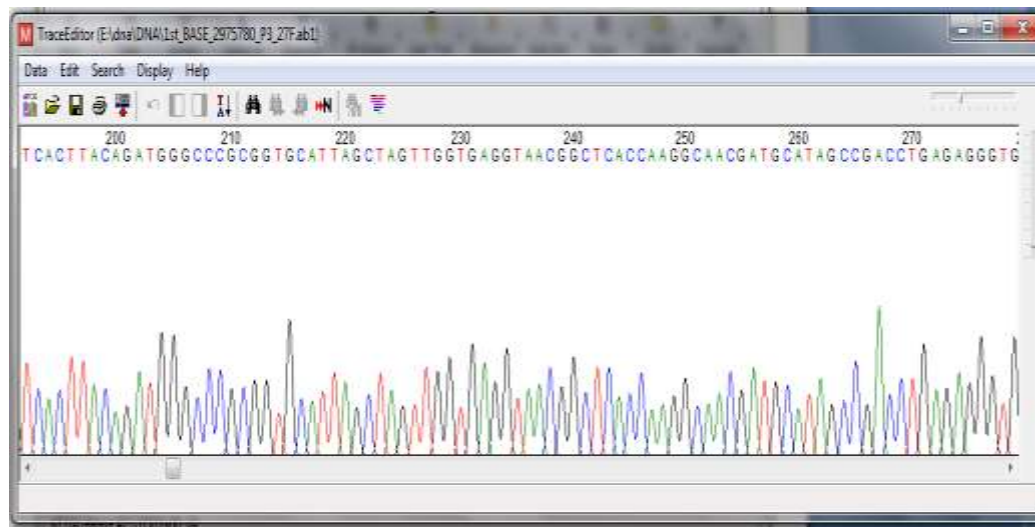
Lampiran 1. Kromatogram Bakteri P1



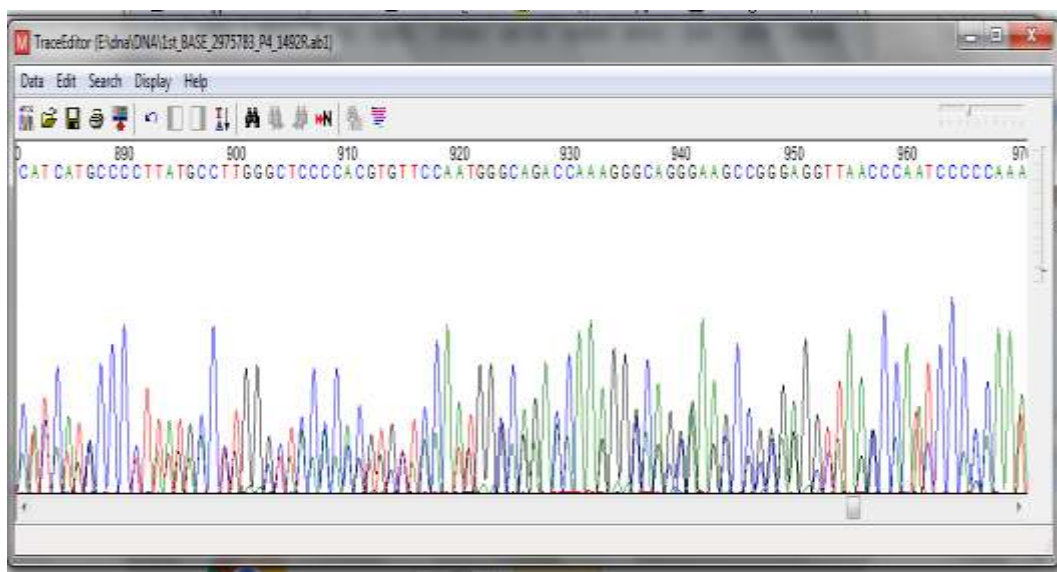
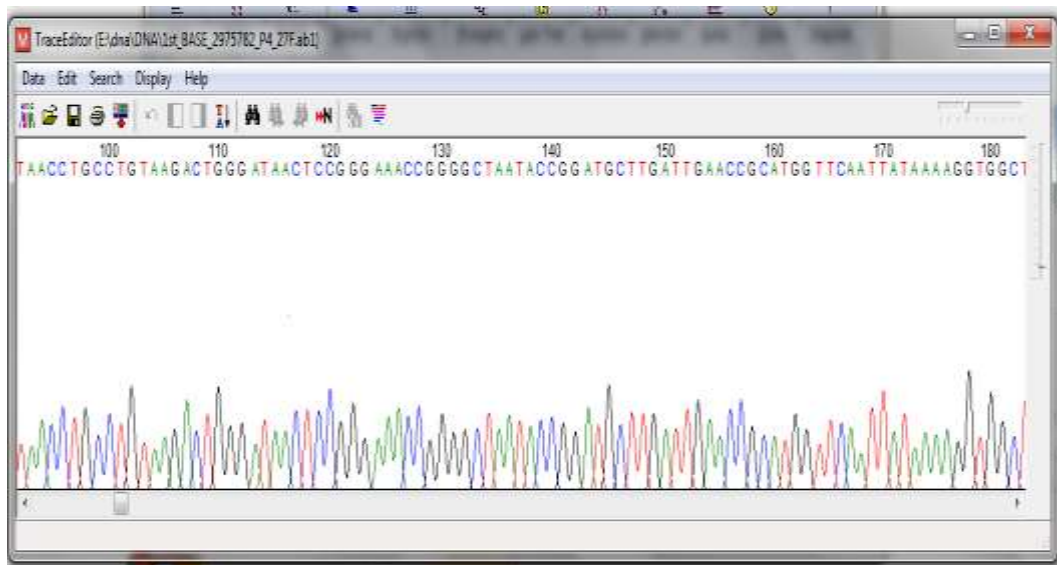
Lampiran 2. Kromatogram Bakteri P2



Lampiran 3. Kromatogram Bakteri P3



Lampiran 4. Kromatogram Bakteri P4



Lampiran 5. Urutan Nekluetida Isolat Bakteri

P1	AGTTTATCCCACCCCCCCCCACCAAAAGAGGGGCG AGGCTTAAAACTCAAAGTGGGGGGAAAAAGTTTTG ACCTCTGGGGAAGCGATAACGGGTGAAAGGGGGG ACCGGTGAGTTAATCCCTTGGAATAATTGCCCTGGATT GGGGGGATTCCCCTTGGAACACGAGGGGCTAATACCG CCATGATCCTAGGGCCCAAAGGGGGGACCTTTGGGC CCTCCCGGGTCCGGGTTTGCTTAGGTGGGATTAGCT AGTTGGTGAGGTAAGGGCTCCCCAAGGCGAACGATC CCTAGCTGGTTTGGAGAGGATGTTACAGCCCCACGG GAACTGAGACCCGGTCCCGGATTCTACGGGAGGCA GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGCAAGCCTG ATGCAACCCATGCCGCGTGTGTTGAAGAAGGCCTTCG GGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGTG TCGTTAATAGCGGCATTGTTTGACGTTAGCGACAGA AGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGG GCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGAT GTGAAAGCCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTG AACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGA ATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGA AGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGA TACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTT CGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTA CGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGAATTGGACGGG GGCCCGCTCAATCGTTGGACCAGGTGGTTTAATTTCT ATGCATCTCTAAGAA
P2	TCTCCCTGGAACCGTGAAATGGCTAAAAAAGTTGAA GAACACCCATGGCCAAAGGCAATTCTCTGTCCGGAA CTTAACGTTAAGCGCCAAAGCCGTGGGAACCAAACA GAATAAAATACCTTGTAATCCACCCCCTAAACCAAT AATGGTTAAGTGTAATAAGGTTCCCGCCTTTAAGGC TGCACCAACCCATTAAGCCTTCCGCCTGGGAAGACG GTCCCAGAATGAAACCTCAAGAATTGAACGGGGCCG CCCAAGCGTGGAAGCTGTGGTTTAATTCGAAGCACC CGAAAACCTTACCAGTCTTGACATCTCTGACAACCTA AAATAAGGCTTCCCCCTTCCGGGCAAATGACAGTGG TGCATGGTTGTCTCCACTCCGGTCCTGGAATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACAAGCGCACCCCTTTGATCTATTG CCCACATTCATTGGGCATCTAAGGGACTGCGGTGAC AACCGAAGGAAGTGGGAATAACTCAATCATCATGCC CTATGACTGGGCTACACCTGCTACATGGGCAAACAA GGCACGAGCCCGAGCTAACAATCCAAATCTTTCAGT CGATAAACGATCGAACCATCCTGAACCTGATCTTAAT

	CGGATCATGCCGGAACCTTCGGCCTTAACCCCCTCAC CAAATGGACCCCATCGGAAACTTTGACCCCAGGGG AAATGGATACTACCAAGTATAAATTCCAAAAACCA TTATTTTTTTTTTAAATTTACCTTCTTTTTTTTAATTT AACTTTAAATATTTTAATTTTTTATTTACTTTTTACAT TATACTTTTTTACCTTCCAAATTTAAATTATATTTTTT TAAAATTATATTAATTTTTTTTTTCCTTC
P3	GCGAGGGGGACCAGCGCGGCCTGCAGTCGAGCGAA CTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGA CGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGAC TGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGAT AACATTTTCTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATG GTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCAT TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAAC GATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC TGGGACTGAGACACGGGCCCAGACTCCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCG GGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC AAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCA GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT GTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGG AACTGGGGAACCTTGAGTGCAAGAGAAAAGCGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA GTACGGTTCGAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT CCTCTGACAACCTCTAGAGATAGAGCGTTCCTTCGG GGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACG AGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTG GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT GACCTGGGCTA
P4	GGGAGGTGCGGCAGCTATACATGCAGTCGAGCGGAC CGATCGGGAGCTTGCTCCCTGTATGTCAGCGGCGGA CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGAC TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT GCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTG GCTTCTACCTCCCCCTTCCGAATGGCCCCCGCCCCA TAACTTATTTGGGAAGGAACCGCTTCACCAAGGCAC

	CAATCCTAACCCAACCTAAAAGGTGAACCGGCCCCC CGGGACCGAAAACCCGCCCAAATCCCACCGGAAGG CACCATAAGGAAACCTCCCCCATGGACCAAATCCG AACGAACCACCCCCCTGAATGAATAAAGGTTTCCG AACCGAAAACCTCCGGTGGTAAGGAAAAACAATTCC CGTCCAAAAAGGCCGGACCCTTACCGGACCCTACCC AAAAACCCCCGCTAAACACCTGGCCACCACCCCCGT AATACCTAAGTGGCCAACCTTTGCCCGAAATAATGG GCCGAAAACCCCCCCCAGCTTCGGTTCCTTAATCCTA ATGGAAAACCCCCCGCTTCACCCGGGAAGGGCCTTG GAAAATGGGGAAATTTAATGGCAAAAAAGAAAATG GAAATCTCCCTGGAACCGTGAAATGGCTAAAAATAT TGAAGAACACCCATTGACCAAAGCCAACCCTTGGCC GGTACTTACAACCTAAGCGCCAAAGCCTGGGGAAACC GACAAGAATAAAATCCCCGGTAATGCCACCCGTAA CCAATAATGCTCAATGGTAGAAGGGTTCTCCCCCTTT ATGGTTGCACACACCCATTAAGCCTCTCCCCGGGGA ATACGTCGCCAGATGAACTTCAAGGATTGACGGGGC CGACCCAACCGTGAACAGGGGTTAATTCAAGTCACC CGAAAACCTTACAGGTCTGACTCCTCGCACACCTAAA TAGGCTTCCTTCGGGGCAATGACGTGGGCTGGTGTCT CACTCTGCCTGAATGTGGTTAGTCCCCACGAGCCACC CTGACTATTGCACATCATTGGATCTAGGGATGCGGG ACACCGAGAGTGGGATACTCATCTCTGCCCTAGACT GGTACACTGCC
--	--

Lampiran 6. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat P1

Download GenBank Graphics Sort by: E value				
Vibrio alginolyticus strain NBRC 15630 16S ribosomal RNA, partial sequence Sequence ID: NR_122050.1 Length: 1541 Number of Matches: 2				
Range 1: 61 to 980 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1376 bits(745)	0.0	876/936(94%)	21/936(2%)	Plus/Plus
Query 79	GGAAA-AAGTT-TTTGACCTCTGGGGAAGCGATAACGG-GTTGAAAGGGGGACCGGTG			135
Sbjct 61	GGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAA-CGATAACGGCGTCG-AGCGGCGGACGGGTG			118
Query 136	AGTTAATCCCTTGGAAAATTGCCCTGGATTGGGGGGATTCCCTTGGAAAACGAGGGCTA			195
Sbjct 119	AGT-AATGCCTAGG-AAATTGCCCT-GATGTGGGGGATAACCATTGG-AAACGATGGCTA			174
Query 196	ATACCGCCATGAT-CCTAGGGCCCAAAG-GGGGGACCTTTGGGCCCTCCCGGTCCGGGT			253
Sbjct 175	ATACCGC-ATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGG-CCTCTCGCTCAGGAT			232
Query 254	TTGCCTTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCCCCAAGGCGAACGATCCCT			313
Sbjct 233	ATGCC-TAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACC AAGGCG-ACGATCCCT			290
Query 314	AGCTGGTTTGGAGAGGATGTTACGCCCCACGGGAACAGAGCCGGTCCCGGATTCCTA			373
Sbjct 291	AGCTGGTCT-GAGAGGATGATCAG-CCACACTGGAACAGAGACCGGT-CCAGACTCCTA			347
Query 374	CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGCAAGCCTGATGCAACCCATGCCG			433
Sbjct 348	CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC-GCAAGCCTGATGC-AGCCATGCCG			405
Query 434	CGTGTTTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAAGTCGTGAGGAAGGCGGTGTCG			493
Sbjct 406	CGTGTTTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCG			465
Query 494	TTAATAGCGGCATTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGC			553
Sbjct 466	TTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGC			525
Query 554	AGCCGCGGTAAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGTGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATG			613
Sbjct 526	AGCCGCGGTAAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCG-GAATTACTGGGCGTAAAGCGCATG			584
Query 614	CAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGTAA			673
Sbjct 585	CAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGTAA			644
Query 674	ACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT			733
Sbjct 645	ACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTCAAGGTGTAGCGGTGAAATGCGT			704
Query 734	AGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGA			793

Lampiran 7. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat P2

Download GenBank Graphics				
Bacillus licheniformis strain NBRC 12200 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: NR_113588.1 Length: 1475 Number of Matches: 1				
Range 1: 385 to 1462 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1170 bits(633)	0.0	943/1092(86%)	27/1092(2%)	Plus/Plus
Query 45	TGAATGAAGAAAGGTTTCCGAACCG-AAAAC	TCGGTGGTAAGGAAAAACAA-TACCCG	102	
Sbjct 385	TGAGTGATG-AAGGTTTTCGATCGTAAACT-CTGTTGTTAGGGAAGACAAGTACCGT	442		
Query 103	TCCAATAAGGCCGGACCTTACCGGACCAACCAAAACCCCGCTTAAC-ACCTGGCC	161		
Sbjct 443	TCGAATAGGGCGGNACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGC-TAACTACGT-GCC	500		
Query 162	ACCA-CCCCCGTAAACCTAAGTGGCCAACTTTG-CCCGAAATAATGGGCCTAAAAccc	219		
Sbjct 501	AGCAGCCGCGGTAACTAGTAGGTGGC-AAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC	559		
Query 220	ccccAGCCGTTTCTTAA-TCTTAATGT-AAAACCCCGCTTACCCGGGAAGGGTTC	277		
Sbjct 560	GCGCAGGCGGTTT-CTTAAGTC-TGATGTGAAAGCCCCGGC-TCAACGGGGAGGG-TC	615		
Query 278	ATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCCAGAAGAGGAAGAGTGGATTCCACGTGTAGCGT	337		
Sbjct 616	ATTGGAACTGGGGAAC-TTGAGTG-CAGAAGAGG-AGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGG	672		
Query 338	TGAATTGCGTAGAGATGTGGAGGACCACAGTGGCGAAGGGGACTCTCTGTTCTGTAAC	397		
Sbjct 673	TGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGGGACTCTCTGGTCTGTAAC	732		
Query 398	GACGTTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAAGCGACCAAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCG	457		
Sbjct 733	GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC	792		
Query 458	GTAAACCGATGAGTGTTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTTGCAGCAAAACCA	517		
Sbjct 793	GTAAA-CGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAAACGCA	851		
Query 518	TTAACCATTCCCCTTGGGGAGTACGGTGGCAAGATTGAAATCAAGGAATTGACGGGGG	577		
Sbjct 852	TTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGG	911		
Query 578	CCCCCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGGGAAGACCTTACCAGTT	637		
Sbjct 912	CCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCTTACCAGGT	971		
Query 638	CTTGACATCTTCTGCCAACCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGCCAGGT	697		
Sbjct 972	CTTGACATCTTCTGNCAACCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGT	1031		
Query 698	GGTGCAATGGTGGTGGTCAGCTGGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	757		

Lampiran 8. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat P3

Download GenBank Graphics					
Bacillus flexus strain NBRC 15715 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Sequence ID: NR_113800.1 Length: 1478 Number of Matches: 1					
Range 1: 29 to 1208 GenBank Graphics Next Match Previous Match 					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2169 bits(1174)	0.0	1179/1181(99%)	2/1181(0%)	Plus/Plus	
Query 22	TGC-AGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG				80
Sbjct 29	TGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG				88
Query 81	TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC				140
Sbjct 89	TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC				148
Query 141	GGATAACATTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAG				200
Sbjct 149	GGATAACATTTTCTTGCATAAGAGAAAATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAG				208
Query 201	ATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCAT				260
Sbjct 209	ATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCAT				268
Query 261	AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACG				320
Sbjct 269	AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC-GGCCAGACTCCTACG				327
Query 321	GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG				380
Sbjct 328	GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG				387
Query 381	AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTA				440
Sbjct 388	AGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTA				447
Query 441	ACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC				500
Sbjct 448	ACTGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC				507
Query 501	GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGC				560
Sbjct 508	GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGC				567
Query 561	GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG				620
Sbjct 568	GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGG				627
Query 621	GGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA				680
Sbjct 628	GGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA				687
Query 681	TGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGA				740
Sbjct 688	TGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGA				747

Lampiran 9. Hasil Identifikasi Bakteri Isolat P4

Download GenBank Graphics					
Bacillus licheniformis strain DSM 13 16S ribosomal RNA, partial sequence Sequence ID: NR_118996.1 Length: 1545 Number of Matches: 1					
Range 1: 44 to 1137 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
446 bits(241)	2e-124	843/1120(75%)	95/1120(8%)	Plus/Plus	
Query 17	ATACATGC-AGTCGAGCGGACCGATCGGGAGCTTGCTCCCTGTATGTCAGCGGCGGACGG				75
Sbjct 44	ATACATGCAAGTCGAGCGGACCGA-CGGGAGCTTGCTCCCT-TAGGTGAGCGGCGGACGG				101
Query 76	GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA				135
Sbjct 102	GTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA				161
Query 136	ATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGTGGCTTCTACCTCCCC				195
Sbjct 162	ATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAAGTGGCTTTAGCTACCAC				221
Query 196	TTCCGAATGGCCCCCGCCCATAACTTATTTGGGAAGG-AACCGCTTCACCAAGGCACC				254
Sbjct 222	TTACAGATGGACCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCT-CACCAAGGCGAC				280
Query 255	AATCCTAACCAACCTAAAAGG-TGAACCGGCCCCC-GGGACCGAAAACCGCCCCAAA				312
Sbjct 281	GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC-GGCCACACTGGGACTGAGA-CACGGCCGAGA				338
Query 313	-TCCACCGGAAGGCACCA-TAAGGAAACCTCCCCATGGACCAAAATCCGAACGAACCA				370
Sbjct 339	CTCCTACGGGA-GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG-ACGGAGCA				396
Query 371	CCCCCCC-TGAATGAATAAAGGTTTCCGAACCG-AAAACCTCCGGTGGTAAGGAAAAACA				428
Sbjct 397	ACGCCGCGTGAGTG-ATGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAG-AACA				454
Query 429	ATTCCCGTCCAAAAAGGCCGACCTTACCGGACCTACCCAAAAACCCCG-CTAAACA				487
Sbjct 455	AGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAATA				514
Query 488	CCTGGCCACCAACCCCG-GTAATACCTAAGTGGCAACCTTTGCCGAAATAATGGGCCGA				546
Sbjct 515	CGT-GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGG-CAAGCGTTGTCGGAATTATTGGCGGT				572
Query 547	AAACCCCCCGAGCTTCGGTTCCTTAATCCTAATG-GAAAAACCCCGCTTACCCGGGA				605
Sbjct 573	AAAGCGCGCGCAGG--CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC-TCAACGGGG				629
Query 606	AGGGCC-TTGGAAAAATGGGAAATTAATGGCAAAAAAGAAAA-TGGAAATCTCC-C-TG				661
Sbjct 630	AGGGCTATTGGAAATTTGGGAACTTGAAT-AGGAGAGAGGAGAGTGGAA-T-TCTAGTG				686