

IDENTIFIKASI MIKROBA YANG KOEKISIS DENGAN ASCIDIA *Lissoclinum patella* MENGGUNAKAN SEKUENS GEN 16S rRNA

(*Identification of the co-exist microbial with ascidian *Lissoclinum patella* by using 16S rRNA gene sequences*)

Patricia Untu^{1*}, Inneke F. M. Rumengan¹, Elvy L. Ginting¹

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado

* e-mail :patricia.untu.100513013@gmail.com

This study was conducted to determine the types of co-existed microbes in ascidians *Lissoclinum patella* with using 16S rRNA gene sequences. The samples that used in this study were taken from tissues of *L. patella* in Malalayang sea water, Manado, North Sulawesi. The samples were inoculated in Hirata medium for ± 1 week. The DNA were isolated from microbial samples, amplification by using the PCR (Polymerase Chain Reaction), electrophoresis agarose gel and data analyze using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in NCBI (National Center for Biotechnology Information). The results show, that there are 15 species of microbes in the Gene Bank that have a high degree of similarity with the 16S rRNA gene sequences of microbial sample, namely cyanobacterium enrichment culture CAWBG121 and CAWBG120 clones, uncultured *Symploca* sp. DRTO clone-55, *Leptolyngbya* sp. PCC7376 complete genome, *Leptolyngbya* sp. PCC7376, uncultured bacterium clone PINFEBB02, uncultured bacterium clone 5M47, *Synechococcus elongatus* CCMP1630, uncultured bacterium clone H09 reef, *Synechococcus* sp. PCC7002 complete genome, *Synechococcus* sp. 16S rRNA gene strain PCC7002, *Synechococcus* sp. DNA for 16 ribosomal RNA, *Synechococcus* sp. L21-BG-1, *Oscillatoria rosea* IAM M-220 and *Synechococcus* sp. PCC 8807. The level similarity of microbes in the NCBI and the microbial samples ranged between 98-99%.

Keywords: *Identification, Co-exist, Ascidian, 16S rRNA gene, Lissoclinum patella*

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan jenis mikroba koeksisi dengan ascidia *Lissoclinum patella* menggunakan sekuens gen 16S rRNA. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari jaringan tissue pada ascidia *L. patella* yang diambil dari perairan Malalayang, Sulawesi Utara. Sampel mikroba diinokulasi dalam media Hirata dan dikultur selama ± 1 minggu. Sampel mikroba tersebut diisolasi DNA, amplifikasi melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis gel agarose dan dianalisis data DNANYA menggunakan BLAST pada NCBI (National Center for Biotechnology Information). Identifikasi yang dilakukan menggunakan BLAST diperoleh hasil 15 mikroba yang memiliki tingkat kemiripan yang tinggi dengan sekuens gen 16S rRNA sampel mikroba yaitu cyanobacterium enrichment culture CAWBG121 dan CAWBG120 clone, uncultured *Symploca* sp. clone DRTO-55, *Leptolyngbya* sp. PCC7376 complete genome, *Leptolyngbya* sp. PCC7376, uncultured bacterium clone PINFEBB02, uncultured bacterium clone 5M47, *Synechococcus elongatus* CCMP1630, uncultured bacterium clone reef H09, *Synechococcus* sp. PCC7002 complete genome, *Synechococcus* sp. 16S rRNA gene strain PCC7002, *Synechococcus* sp. DNA untuk 16 ribosomal RNA, *Synechococcus* sp. L21-BG-1, *Oscillatoria rosea* IAM M-220 dan *Synechococcus* sp. PCC 8807. Tingkat kemiripan mikroba dalam NCBI dengan sampel H1 berkisar antara 98-99 %.

Kata kunci: *Identifikasi, Koeksisi, Ascidia, 16S rRNA, Lissoclinum patella*

PENDAHULUAN

Organisme yang dijumpai di dalam lautan memiliki bentuk yang sangat bervariasi. Selain bentuk yang bervariasi, didapati juga adanya

interaksi atau hubungan yang terjadi diantara organisme dengan spesies yang berbeda di dalam lautan. Hubungan antar organisme tersebut nampaknya tidak saling merugikan satu

dengan yang lain, bahkan berguna untuk satu atau keduanya (Nybakken, 1992). Contoh hubungan yang terjalin antar organisme di dalam lingkungan laut adalah ascidia dan mikroba. Hubungan tersebut memberikan keuntungan bagi keduanya (Hirose & Maruyama, 2004; Donia *et al.*, 2011)

Ascidia adalah golongan tunikata laut yang termasuk dalam organisme invertebrata laut (Schimdt *et al.*, 2005). *Lissoclinum patella* adalah salah satu spesies ascidia yang mempunyai mikroba di dalam tubuhnya. Penelitian Lewin and Cheng (1989) memberikan informasi awal terhadap keberadaan mikroba di dalam ascidia *L. patella* yakni prokariot fotosintetik yang dinamakan *Prochloron*. Keadaan lingkungan dalam tubuh ascidia yang unik (Behrendt *et al.*, 2012) memungkinkan tidak hanya satu mikroba saja yang dapat hidup dan tinggal di dalamnya.

Ascidia *L. patella* sebagai tempat tinggal dan berlindung (Hirose & Maruyama, 2004) memberikan kontribusi bagi mikroba untuk dapat hidup dan memproduksi senyawa-senyawa bermanfaat khususnya untuk keberlangsungan hidup dari ascidia *L. patella* sendiri. Penelitian Donia *et al.* (2006) menunjukkan bahwa mikroba yang diisolasi dari dalam ascidia *L. patella* dapat menghasilkan suatu senyawa yang dinamakan *patellamide*. Menurut Schimdt *et al.* (2005), *patellamide* adalah produk yang dapat digunakan dalam bidang kesehatan.

Fakta bahwa mikroba yang hidup dalam ascidia *L. patella* dapat bermanfaat bagi kehidupan, membuat penelitian untuk mengeksplorasinya perlu untuk dilakukan. Namun, hingga saat ini masih sedikit penelitian yang dilakukan untuk mengeksplorasi keberadaan mikroba dari ascidia *L. patella* khususnya yang berada di perairan Sulawesi Utara melalui penelitian skala DNA atau skala molekuler. Perkembangan teknologi dalam bidang molekuler seperti teknologi PCR dan DNA Barcoding,

memungkinkan untuk dilakukan penelitian hingga pada skala DNA khususnya untuk mengidentifikasi mikroba pada ascidia *L. patella* di perairan Malalayang, Sulawesi Utara. Keuntungan yang diperoleh lewat penelitian skala DNA atau skala molekuler ini adalah kecepatan dan hasil yang didapat lebih spesifik, serta dapat mendeteksi sampai pada tingkat molekul DNA (Biotek LIPI, t.t).

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah menentukan DNA dari mikroba dan memperoleh jenis-jenis mikroba yang koeksis dengan ascidia *L. patella*.

METODE PENELITIAN

Sampel ascidia *L. patella* diambil dengan cara menyelam menggunakan alat selam SCUBA, di perairan Malalayang, Sulawesi Utara. Lokasi pengambilan sampel ascidia ditunjukkan pada Gambar 1. Sampel ascidia diambil dengan menggunakan pisau karena ascidia hidup menempel pada karang (Bak *et al.*, 1981 dan Littler, 1995 *dalam* Donia *et al.*, 2011). Sampel ascidia selanjutnya diletakkan dalam plastik sampel yang berisi air laut. Pengambilan sampel mikroba dilakukan di lapangan dengan cara menekan tubuh ascidia (Lewin and Cheng, t.t). Perlakuan ini dilakukan secara aseptik dengan menggunakan lampu spiritus. Erlenmeyer yang berisi sampel mikroba selanjutnya dikocok. Sampel tersebut kemudian dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmakologi Kelautan untuk proses menumbuhkan mikroba. Proses menumbuhkan mikroba dalam media berlangsung selama ± 1 minggu. Sampel mikroba yang telah ditumbuhkan selanjutnya dibawa ke Laboratorium Divisi Bioteknologi, FMIPA, UNSRAT untuk diisolasi DNANYA. Metode yang digunakan untuk isolasi DNA adalah dengan menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Bahan yang digunakan



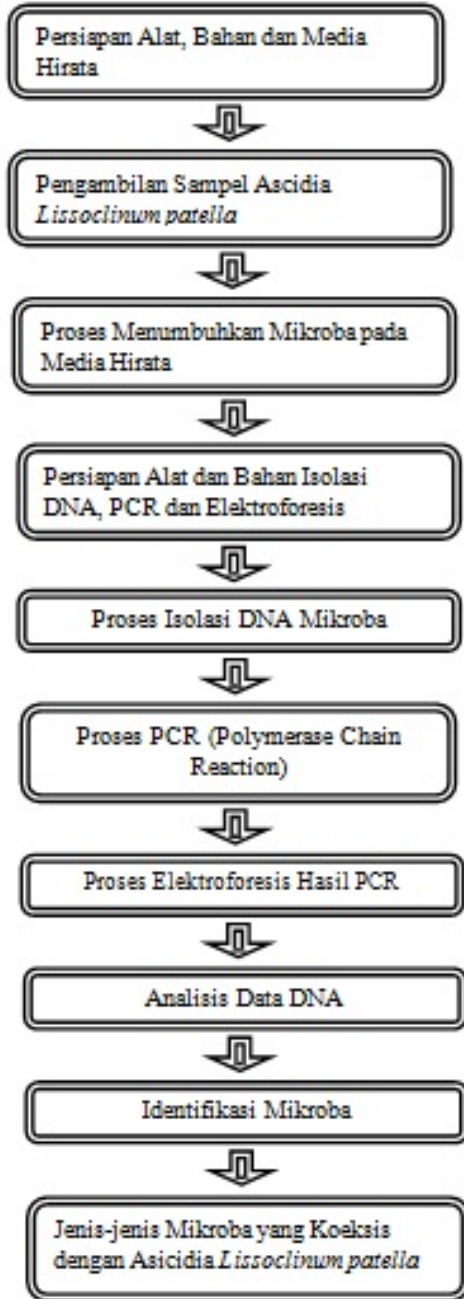
Gambar 1. Lokasi Pengambilan Sampel

dalam isolasi DNA adalah 1000 μ l sampel mikroba yang diisolasi pada media hirata, serta kit isolasi DNA sampel (Geneaid). Proses berikutnya setelah isolasi DNA adalah proses PCR. Kit PCR yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2X Top Taq PCR Master Mix (Qiagen) sedangkan untuk bahan-bahan yang digunakan adalah primer forward 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), primer reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 2 μ l DNA template (DNA cetakan), 11 μ l ddH₂O, dan 4 μ l coral load.

Proses PCR dimulai dari tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus, tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, tahap *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1,5 menit dan tahap pemanjangan akhir dengan suhu 70°C selama 1 menit.

Hasil PCR dilihat dengan menggunakan elektroforesis gel agarose. Bahan-bahan yang digunakan adalah MaestroSafe Prestained dan Nucleic Acid Gel Stain (MaestroGen, Taiwan) yang disimpan pada suhu 4°C, 250 μ l 10X sample loading dye, 10 mg/ml (50 μ l) ethidium bromide, agarose NA sebanyak 5 g, 0,1 μ g/ μ l ladder DNA marker yang disimpan pada suhu -20°C. Hasil PCR tersebut selanjutnya dikirim ke First Base Laboratories, Malaysia untuk disekuensing. Sekuensing yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan software Geneious v5.6 (Drummond *et al.*, 2012 dalam Kolondam, 2015) dan BLAST di pangkalan data gen (GenBank) dalam NCBI (National Center for Biotechnology Information). Data kromatogram hasil sekuensing selanjutnya diedit dan dicari kemiripannya dengan menggunakan

BLAST. Alur kerja penelitian ini digambarkan dalam suatu bagan proses kerja yang ditampilkan pada Gambar 2.



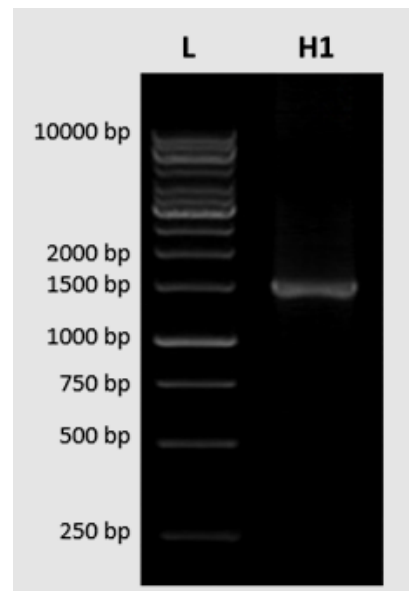
Gambar 2. Alur Kerja Penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kesuksesan Reaksi PCR Gen 16S rRNA Sampel Mikroba

Kesuksesan suatu reaksi PCR terlihat melalui *band* atau pita yang dihasilkan ketika hasil amplifikasi divisualisasikan melalui alat UV-transiluminator (Lamboy, 1994). Gambar 3 memperlihatkan hasil reaksi PCR dari gen 16S rRNA sampel mikroba yang telah divisualisasikan menggunakan UV-transiluminator.

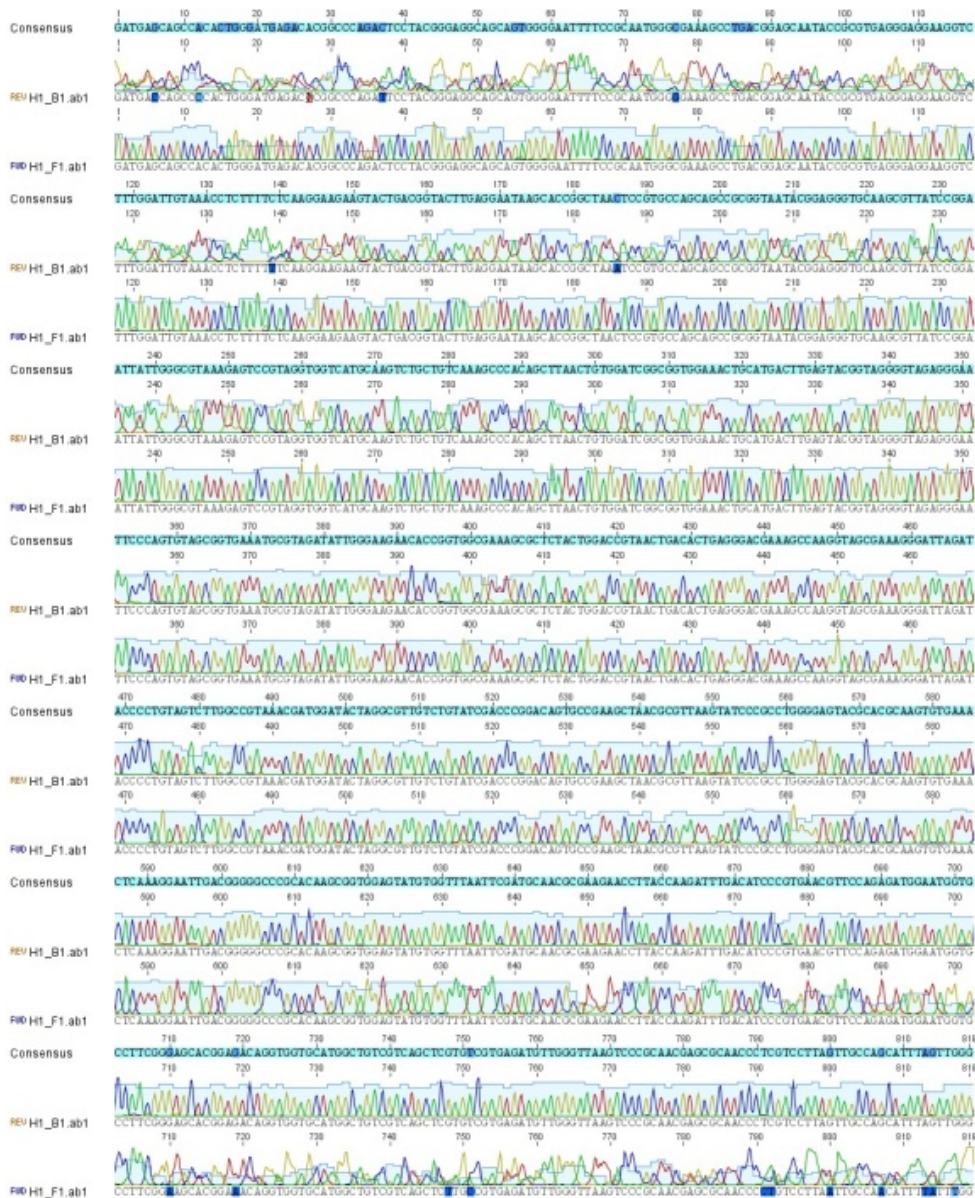
Pita (*band*) sampel mikroba yang dihasilkan memiliki ciri-ciri berupa pita tunggal dan tebal. Pita tersebut berukuran mendekati marker 1,5 kbp. DNA target untuk amplifikasi melalui PCR kurang lebih berukuran 1,4 kbp sehingga targetnya tercapai. Pita sampel mikroba bahkan terlihat lebih tebal daripada pita marker (konsentrasi DNA ladder = 0,1 µg/µl pada volume yang sama. Hal tersebut mengindikasikan bahwa konsentrasi hasil PCR sampel mikroba lebih tinggi sehingga dianggap cukup untuk diproses ke tahap sekuensing.



Keterangan:

- L. Ladder DNA Marker
- H1. Elektroforesis Hasil PCR Sampel Mikroba

Gambar 3. Elektroforesis gel agarosa 1% dari sampel mikroba.



Gambar 4. Penjajaran (*alignment*) Sekuens Parsial 16S rRNA Sampel Mikroba dari Sekuensing Bi-direksional

Penjajaran Kromatogram Sekuens 16S rRNA Sampel Mikroba

Sekuens DNA yang diperoleh dalam bentuk kromatogram disunting menggunakan software Geneious v5.6 (Drummond *et al.*, 2012 *dalam* Kolondam, 2015). Semua data sekuens yang ada (sampel mikroba, primer forward dan reverse) disejajarkan dengan menggunakan program MUSCLE (*Multiple Sequence Alignment*) yang terintegrasi dalam

program Geneious v5.6 (Edgar, 2004 *dalam* Kolondam, 2015). Penjajaran (*alignment*) ini merupakan jenis penjajaran bi-direksional (dua arah). Metode bi-direksional ini memiliki keuntungan yaitu dapat saling mencakup sekuens yang tidak bisa dibaca sekuens pasangannya. Keuntungan lainnya yaitu apabila terdapat kesalahan pada pembacaan sekuens DNA maka bisa dikoreksi oleh sekuens komplementernya.

Kromatogram yang bersih dan bisa digunakan sebagai hasil sekuensing memiliki panjang 819 bp. Kromatogram hasil sekuensing fragmen DNA ini juga menunjukkan adanya puncak-puncak dengan 4 warna yang berbeda. Warna-warna yang berbeda tersebut masing-masing mewakili basa pirimidin dan basa purin tertentu. Basa pirimidin terdiri dari timin yang disimbolkan dengan huruf T dan sitosin yang disimbolkan dengan huruf C sedangkan basa purin terdiri dari adenin yang disimbolkan dengan huruf A dan guanin yang disimbolkan dengan huruf G (Dale & Park, 2010). Keberadaan puncak-puncak yang bervariasi pada kromatogram sampel mikroba menunjukkan adanya bagian yang tidak baik dan bagian yang baik. Bangol *dkk.* (2014) mengemukakan bahwa hasil sekuensing yang baik ditunjukkan oleh grafik dengan puncak yang tinggi dan saling terpisah satu sama lain. Hasil sekuensing yang tidak baik ditunjukkan dengan puncak yang landai dan tidak saling terpisah satu sama lain atau terdapat puncak ganda pada kromatogram.

Gambar 4 merupakan kromatogram hasil penjajaran (*alignment*) sekuens parsial 16S rRNA sampel mikroba. Kromatogram tersebut menunjukkan bagian-bagian yang dinamakan "*consensus*", ^{REV}H1_B1.ab1, dan ^{FWD}H1_F1.ab1. "*Consensus*" merupakan hasil penjajaran sekuens dua arah gen 16S rRNA dari sampel H1. ^{REV}H1_B1.ab1 adalah sekuens yang disekuensing menggunakan primer reverse sedangkan ^{FWD}H1_F1.ab1 adalah sekuens yang disekuensing menggunakan primer forward. Basa nukleotida nomor 1-230 pada kromatogram memberikan visualisasi puncak-puncak yang baik dan tidak baik serta terdapat beberapa perbedaan pada basa nukleotidanya. Puncak dengan hasil yang tidak baik ditunjukkan dengan ciri-ciri yaitu, tidak

terpisah satu sama lain dan terlihat tumpang tindih. Puncak tersebut berada pada bagian ^{REV}H1_B1.ab1. Puncak yang baik ditunjukkan dengan ciri-ciri yaitu, terpisah satu sama lain dan tidak saling tumpang tindih. Puncak tersebut berada pada bagian ^{FWD}H1_F1.ab1. Puncak yang tidak baik dan adanya perbedaan basa pada bagian ^{REV}H1_B1.ab1 merupakan visualisasi dari pembacaan yang kurang baik namun pembacaan yang kurang baik tersebut telah dicover oleh bagian ^{FWD}H1_F1.ab1.

Hal yang sama terjadi pada basa nukleotida nomor 710-819 namun perbedaan pembacaan basa terdapat pada bagian ^{FWD}H1_F1.ab1. Puncak-puncak yang ada dikategorikan ke dalam hasil yang tidak baik karena puncak yang ada tersebut tidak saling terpisah satu dengan yang lain dan saling tumpang tindih. Hal berbeda terlihat pada puncak-puncak yang dihasilkan pada bagian ^{REV}H1_B1.ab1. Puncak-puncak yang ada menunjukkan hasil yang jelas dengan ciri-ciri yaitu, memiliki puncak yang tinggi dan saling terpisah satu dengan yang lain. Hal ini membuat pembacaan yang kurang baik oleh bagian ^{FWD}H1_F1.ab1 dicakup dengan pembacaan yang baik oleh bagian ^{REV}H1_B1.ab1.

Sekuens 16S rRNA sampel mikroba yang diperoleh dari hasil sekuensing ditunjukkan pada Gambar 5. Sekuens tersebut dibuat dalam bentuk format FASTA untuk memudahkan pemindahan text antar-platform penyunting sekuens DNA ke pencari sekuens database GenBank. Sekuens DNA dalam format FASTA dimasukkan sebagai *query* dalam BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada GenBank NCBI yang bertujuan untuk mengetahui data mikroba apa saja yang memiliki kesamaan tertinggi dengan sampel mikroba.

```

>H1
GATGAGCAGCCACACTGGGATGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAG
GAAGGTCTTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAGAAGTACTGACGGTACTT
GAGGAATAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGTCCGTAGGTGGTCATGCAAGTCT
GCTGTCAAAGCCCACAGCTTAACTGTGGATCGGCGGTGAAACTGCATGACTTGA
GTACGGTAGGGGTAGAGGGAATCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGG
GAAGAACACCCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGACCGTAACTGACACTGAGGGACG
AAAGCCAAGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTGGCCGTAAACGAT
GGATACTAGGCGTTGTCTGTATCGACCCGGACAGTGCCGAAGCTAACGCGTTAAG
TATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTAC
CAAGATTTGACATCCCCTGAACGTTCCAGAGATGGAATGGTGCCTTCGGGAGCAC
GGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG

```

Gambar 5. Sekuens 16S rRNA Sampel Mikroba dalam Format FASTA

Ostell *et al.* (2001) mengemukakan bahwa format FASTA memuat sebuah baris definisi dan karakter dari sekuens yang dapat digunakan sebagai input bagi sebuah variasi dari program-program analisis. Hal inilah yang dimanfaatkan untuk memperoleh informasi jenis mikroba yang memiliki tingkat kesamaan tertinggi dengan sampel mikroba melalui input format FASTA tersebut sebagai *query* dalam BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada GenBank NCBI. Selain itu, sekuens dalam format FASTA tersebut juga akan memudahkan pemindahan text antar-platform penyunting sekuens DNA ke pencari sekuens database GenBank pada NCBI.

Identifikasi Mikroba Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA

Pencarian yang dilakukan menggunakan BLAST dalam GenBank pada NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menghasilkan data seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.

Pada gambar 6 dapat dilihat bahwa nilai *query cover* dari setiap mikroba pada GenBank yang memiliki tingkat kesamaan tertinggi dengan sampel mikroba menunjukkan angka 100 %. Hal ini menunjukkan bahwa, *query* dari mikroba-mikroba dalam GenBank mencakup seluruh bagian *query* dari sampel mikroba. Berdasarkan hasil penelusuran tersebut, mikroba-mikroba pada GenBank yang memiliki tingkat kemiripan tertinggi dengan sekuens sampel mikroba dari media hirata ditunjukkan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 tersebut terdapat kode akses dari setiap mikroba. Kode akses tersebut digunakan untuk memperoleh data dari mikroba pada GenBank dalam NCBI. Selain itu, kode akses tersebut juga digunakan sebagai input dalam NCBI untuk penjajaran (*alignment*) sekuens mikroba dengan sekuens sampel mikroba. Hasil penjajaran (*alignment*) yang diperoleh memperlihatkan kemiripan dari sekuens sampel mikroba dan mikroba dalam GenBank. Penjajaran (*alignment*) tersebut ditunjukkan oleh Gambar 7 yang merupakan penjajaran sekuens

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1469	1469	100%	0.0	99%	KC818267.1
Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG120 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1469	1469	100%	0.0	99%	KC818266.1
Uncultured <i>Symploca</i> sp. clone DRTO-55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	100%	0.0	99%	KP182358.1
Leptolyngbya sp. PCC 7376, complete genome	1447	2888	100%	0.0	99%	CP003946.1
Leptolyngbya sp. PCC 7376 16S ribosomal RNA, complete sequence	1441	1441	100%	0.0	98%	NR_102456.1
Uncultured bacterium clone PINFEBB02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1441	1441	100%	0.0	98%	JQ727058.1
Uncultured bacterium clone 5M47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1441	1441	100%	0.0	98%	JF272151.1
Synechococcus elongatus CCMP1630 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1430	1430	100%	0.0	98%	AY946243.1
Uncultured bacterium clone Reef_H09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1424	1424	100%	0.0	98%	GU119296.1
Synechococcus sp. PCC 7002, complete genome	1424	2849	100%	0.0	98%	CP000951.1
Synechococcus sp. 16S rRNA gene, strain PCC 7002	1424	1424	100%	0.0	98%	AJ000716.1
Synechococcus sp. DNA for 16S ribosomal RNA	1424	1424	100%	0.0	98%	D88289.1
Synechococcus sp. L21-BG-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1419	1419	100%	0.0	98%	KJ206338.1
Oscillatoria rosea IAM M-220 gene for 16S ribosomal RNA	1417	1417	100%	0.0	98%	AB003164.1
Synechococcus sp. PCC 8807 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1413	1413	100%	0.0	98%	AF448076.1

Gambar 6. Hasil Penelusuran BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) di NCBI (diakses tanggal 18 Juni 2015).

sampel mikroba dengan sekuens mikroba yang memiliki kemiripan tertinggi yaitu *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121*.

Tabel 1. Mikroba yang Memiliki Tingkat Kemiripan Tertinggi dengan Sampel Mikroba

No	Kode Akses	Jenis Mikroba	Kemiripan
1.	KC818267	<i>Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121</i>	99 %
2.	KC818266	<i>Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG120</i>	99 %
3.	KP182358	Uncultured <i>Symploca</i> sp. clone DRTO-55	99 %
4.	CP003946	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC7376 complete genome	99 %
5.	NR102456	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC7376	98 %
6.	JQ727058	Uncultured bacterium clone PINFEBB02	98 %
7.	JF272151	Uncultured bacterium clone 5M47	98 %
8.	AY946243	<i>Synechococcus elongatus</i> CCMP1630	98 %
9.	GU119296	Uncultured bacterium clone Reef H09	98 %
10.	CP000951	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002, complete genome	98 %
11.	AJ000716	<i>Synechococcus</i> sp. 16S rRNA gene, strain PCC 7002	98 %
12.	D88289	<i>Synechococcus</i> sp. DNA for 16S ribosomal RNA	98 %
13.	KJ206338	<i>Synechococcus</i> sp. L21-BG-1	98 %
14.	AB003164	<i>Oscillatoria rosea</i> IAM M-220	98 %
15.	AF448076	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 8807	98 %

Jumlah basa nukleotida sampel mikroba yang sama atau mirip dengan basa nukleotida *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121* adalah 812 dari 820 basa. Dengan kata lain, terdapat 8 perbedaan pada hasil sekuens sampel mikroba dan *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121*. Perbedaan tersebut ditandai dengan tidak adanya garis tegak lurus sebagai tanda kesamaan basa pada kedua sekuens. Perbedaan-perbedaan tersebut terdapat pada basa nukleotida nomor 235, 368, 510, 898, 912, 927, 1022 dan 1027 untuk sekuens *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121*. Perbedaan pada sampel mikroba ditemukan pada basa nukleotida nomor 21, 133, 295, 683, 697, 712, 807 dan 812. Selain itu, basa nukleotida nomor 21 pada sekuens sampel mikroba tidak terlihat adanya huruf yang menunjukkan kode basa.

Download ▾ GenBank Graphics

Cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121 16S ribosomal RNA gene, partial se
Sequence ID: [gb|KC818267.1](#) Length: 1386 Number of Matches: 1

Range 1: 215 to 1034 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous M

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1469 bits(795)	0.0	812/820(99%)	1/820(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      GATGAGCAGCCACACTGGGA-TGAGACACGGCCCAAGCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 59
Sbjct 215    GATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAAGCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 274

Query 60     GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAAGCTGACGAGCAATAACCGCGTGAAGGAGGAAAGSTCTT 119
Sbjct 275    GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAAGCTGACGAGCAATAACCGCGTGAAGGAGGAAAGSTCTT 334

Query 120    TGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAAGAACTGACGAGTACTGACGTAAGTAAAGCACC 179
Sbjct 335    TGGATTGTAAACCTCTTTTCTCAAGGAAAGAACTGACGAGTACTGACGTAAGTAAAGCACC 394

Query 180    GGTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTAT 239
Sbjct 395    GGTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTAT 454

Query 240    TGGGCGTAAAGAGTCCGTAGSTGGTCAATGCAAGTCTGCTGTCAAAGCCCAAGCTTAACT 299
Sbjct 455    TGGGCGTAAAGAGTCCGTAGSTGGTCAATGCAAGTCTGCTGTCAAAGCCCAAGCTTAACT 514

Query 300    GTGGATCGGCGGTGGAAAAGTGCATGACTTGAATACGGTACGGGTAGAGGGAAATCCCAAGT 359
Sbjct 515    GTGGATCGGCGGTGGAAAAGTGCATGACTTGAATACGGTACGGGTAGAGGGAAATCCCAAGT 574

Query 360    GTAAGCGTAAAGTGCATGATATTGGGAAAGAACCCGGTGGCGAAAAGCGCTCTACTGGAC 419
Sbjct 575    GTAAGCGTAAAGTGCATGATATTGGGAAAGAACCCGGTGGCGAAAAGCGCTCTACTGGAC 634

Query 420    CGTAACTGACACTGAGGGACGAAAAGCCAAAGTACGAAAGGGATAGATAACCCCTGTAGT 479
Sbjct 635    CGTAACTGACACTGAGGGACGAAAAGCCAAAGTACGAAAGGGATAGATAACCCCTGTAGT 694

Query 480    CTTGGCCGTAAGCAGTGGATACTAGGCGTTGTCTGTATCGACCCGGCAGTGGCGAAAGCT 539
Sbjct 695    CTTGGCCGTAAGCAGTGGATACTAGGCGTTGTCTGTATCGACCCGGCAGTGGCGAAAGCT 754

Query 540    AACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGACGCAAGTGTGAAACTCAAGGAAATTGA 599
Sbjct 755    AACGCGTTAAGTATCCCGCTGGGGAGTACGACGCAAGTGTGAAACTCAAGGAAATTGA 814

Query 600    CGGGGCCCCGCAAAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTA 659
Sbjct 815    CGGGGCCCCGCAAAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTA 874

Query 660    CCAAGATTTGACATCCCGTGAACGTTCCAAGATGGAATGGTCCCTTCGGGAGCACGGAAG 719
Sbjct 875    CCAAGATTTGACATCCCGTGAACGTTCCAAGATGGAATGGTCCCTTCGGGAGCACGGAAG 934

Query 720    ACAGSTGATGATGGCTGTCTGACGCTCGTGTGATGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC 779
Sbjct 935    ACAGSTGATGATGGCTGTCTGACGCTCGTGTGATGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC 994

Query 780    GAGCGCAACCCCTCGTCTTAAAGTGGCAGCATTAAAGTTGGG 819
Sbjct 995    GAGCGCAACCCCTCGTCTTAAAGTGGCAGCATTAAAGTTGGG 1034

```

Gambar 7. Penjajaran (*Alignment*) Sampel Mikroba dengan *Cyanobacterium* (Nomor Akses: KC818267)

Tingkat kemiripan 99% yang diperoleh merupakan nilai total dari jumlah basa mikroba pada GenBank dibagi dengan total jumlah basa yang sama dengan sampel mikroba, dalam hal ini 820 basa dibagi 812 basa.

Identifikasi Mikroba Koeksis dengan *Ascidia L. patella*

Berdasarkan data DNA yang ada, sebagian besar mikroba yang mirip dengan sampel mikroba dari *ascidia L. patella* yang dikultur pada media hirata didominasi oleh Sianobakteri. Hal ini sesuai dengan pendapat Kott, (1982); Kott *et al.*, (1984) dalam Hirose *et al.*, (2012) yang mengemukakan bahwa beberapa jenis *ascidia* memiliki hubungan dengan Sianobakteri.

Sianobakteri adalah grup prokariotik autotrof purba yang berukuran besar, dan dapat melakukan fotosintesis. Sianobakteri mengandung substansi intraseluler seperti glikogen, cyanophycin, fikobiliprotein dan polifosfat (Rai *et al.*, 2000). Sianobakteri juga memiliki sebuah membran berisi nukleus dan membran yang berisi organel-organel (Fogg *et al.*, 1973 dalam Watkinson, 1999). Sianobakteri dapat hidup apabila terdapat unsur-unsur yang mendukung kehidupannya seperti nitrogen, fosfor, besi, dan molibdenum (Watkinson, 1999).

Sampel mikroba memiliki tingkat kemiripan tertinggi dengan Sianobakteri jenis *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121* yang

dikoleksi dari daerah aliran sungai Utakura yang dinamakan aliran Waihau, New Zealand. Daerah pelabuhan Hokinga di New Zealand memperoleh masukan air tawar yang cukup signifikan dari danau Omapere melalui sungai Utakura (Wall *et al.*, 2013). Kondisi perairan Malalayang yang merupakan lokasi pengambilan sampel ascidia *L. patella* juga mengalami hal yang sama yaitu mendapat masukan air tawar dari daerah aliran sungai yang jaraknya \pm 100 m dari lokasi tersebut seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil identifikasi data DNA mikroba pada GenBank yang mirip dengan sampel mikroba isolat dari ascidia *L. patella*, diperkirakan bahwa keberadaan mikroba pada ascidia *L. patella* di perairan Malalayang berasal dari mikroba dalam air tawar yang masuk ke perairan melalui aliran sungai di dekat lokasi pengambilan ascidia. Mikroba tersebut masuk ke dalam ascidia melalui cara makan *filter feeder*. *Filter feeder* adalah proses dimana ascidia menangkap partikel sedimen yang berasal dari lingkungan luar. Sedimen tersebut perlahan jatuh ke dalam oral siphons bersamaan dengan air yang rata-rata masuk berkisar antara 2-3 liter sampai 18,5 liter per jam (Daniel & Therriault, 2007). Proses tersebut dinamakan *horizontal transmission*.

KESIMPULAN

Data DNA mikroba dalam GenBank yang mirip dengan sampel isolat mikroba dari ascidia *L. patella* menunjukkan letak kemiripan dan persentase tingkat kemiripan. Tingkat kemiripan tertinggi antara sekuens mikroba dalam GenBank dan sampel isolat mikroba berada pada nilai 99 %.

Identifikasi menggunakan sekuens gen 16S rRNA menunjukkan bahwa mikroba yang koeksis dengan ascidia *L. patella* di perairan Malalayang berasal dari golongan

Sianobakteri jenis *cyanobacterium enrichment culture clone CAWBG121*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bangol, I., L. I. Momuat., dan M. Kumaunang. 2014. Barcode DNA Tumbuhan Pangi (*Pangium edule*). Berdasarkan Gen matK. *Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE*, 3 (2): 113-119.
- Behrendt, L., A. W. D. Larkum., E. Trampe., A. Norman., S. J. Sorensen, and M. Kuhl. 2012. Microbial Diversity of Biofilm Communities in Microniches Associated with The Didemnid Ascidian *Lissoclinum patella*. *The ISME Journal*, 6: 1222-1237.
- Bioteknologi LIPI. (t.t). Diagnostik Molekuler: Potensi dalam Jasa dan Penelitian Kesehatan. Diunggah 5 Maret 2015, dari <http://www.biotek.lipi.go.id/>.
- Daniel, K. S., and T. W. Therriault. 2007. Biological Synopsis of The Invasive Tunicate *Didemnum sp.* *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2788 (6): 53.
- Dale, J. W., and S. F. Park. 2010. *Molecular Genetics of Bacteria*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., Publication. p 388.
- Donia, M.S., B.J. Hathaway., S. Sudek., M.G. Haygood. M.J. Rosovitz., J. Ravel. and E.W. Schimdt. 2006. Natural Combinatorial Peptide Libraries In Cyanobacterial Symbionts of Marine Ascidiaceans. *Nature Publishing Group*, 2 (12): 729-735.
- Donia, M.S., W.F. Fricke., F. Partensky., J. Cox., S.I. Elshahawi., J.R. White., A.M. Phillippy., M.C. Schatz., J. Piel.,

- M.G. Haygood., J. Ravel., dan E.W. Schmidt. 2011. Complex Microbiome Underlying Secondary and Primary Metabolism In The Tunicate-Prochloron Symbiosis. *PNAS PLUS Microbiology*, 108 (51): 1423-1432.
- Hirose, E. and T. Maruyama. 2004. What Are The Benefits In The Ascidian-Prochloron Symbiosis. *Endocytobiosis Cell Res*, 15: 51-62.
- Hirose, E., X. Turon., S. Lopez-Legentil., P.M. Erwin., and M. Hirose. 2012. First Records Of Didemnid Ascidiens Harboring Prochloron From Caribbean Panama: Genetic Relationships Between Caribbean And Pacific Photosymbionts And Host Ascidiens. *Taylor and Francis Group*, 10 (4): 435-445.
- Kolondam, B.J. 2015. Applying matK Gene for Identification of Liliopsida Plant Species From North Sulawesi Through Bold Systems. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6 (2): 242-245.
- Lambooy, W.F. 1994. Computing Genetic Similarity Coefficients from RAPD Data: The Effects of PCR Artifacts. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 4: 31-37.
- Lewin, R.A and L. Cheng. 1989. *Prochloron: A Microbial Enigma*. Chapman and Hall. New York. p 115.
- Lewin, R.A dan L. Cheng. (t.t). *Collection and Handling of Prochloron and Its Ascidian Hosts*. In: R. A. Lewin & L. Cheng (Eds.). *Prochloron A Microbial Enigma*. New York: Chapman & Hall, Inc. 9 pp.
- Nybakken, J.W. 1992. *Biologi Laut: Suatu Pendekatan Ekologis*. Eidman, M., Koesoebiono, D.G. Begen, M. Hutomo., dan S. Sukardjo [Penerjemah]. Terjemahan dari: *Marine Biology: An Ecological Approach*. PT.Gramedia. Jakarta. 459 hal.
- Ostell, J. M., S. J. Wheelan., and J. A. Kans. 2001. *The NCBI Data Model*. In: A. D. Baxevanis & B. F. F. Ouellette (Eds.). *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Second Edition*. John Wiley & Sons, Inc. 19-43 pp.
- Rai, A. N., E. Soderback., and B. Bergman. 2000. Cyanobacterium-Plant Symbioses. *Review New Phytol*, 147: 449-481.
- Schmidt, W.E., J.T. Nelson., D.A. Rasko., S. Sudek., J.A. Elson., M.G. Haygood. and J. Ravel. 2005. Patellamide A and C Biosynthesis By A Microcin-like Pathway in Prochloron didemni, The Cyanobacterial Symbiont of Lissoclinum patella. *The National Academy of Sciences of The USA*, 102 (20): 7315-7320.
- Watkinson, A. 1999. *Ecophysiology of Marine Cyanobacterial Blooms. Literature Review* Submitted to The Department of Botany, University of Queensland. Australia. p 48.