

## IDENTIFIKASI MOLEKULER SPESIES MIKROBA FOTOSINTETIK YANG BERASOSIASI DENGAN ASCIDIACEA DI TELUK MANADO

*(Molecular Identification of Photosynthetic Species of Microbe that Associated with Ascidiacea in Manado Bay)*

Angelicca L.D.M. Angkouw<sup>1</sup>, Inneke F.M. Rumengan<sup>2\*</sup>, Joice R.T.S.L. Rimper<sup>1</sup>, Medy Ompi<sup>1</sup>, Deiske A. Sumilat<sup>2</sup>, Robert A. Bara<sup>2</sup>

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia
2. Program Studi Magister Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi Manado

\*Penulis Korespondensi : [innekerumengan@unsrat.ac.id](mailto:innekerumengan@unsrat.ac.id)

### ABSTRACT

The objective of this study was to molecularly determine the microbial species. The isolation of microbes from their hosts was conducted by squeezing the tissues that contain green suspension. The suspension was then kept in a freezer until DNA isolation. DNA isolation was performed with standard procedur, following with PCR amplification using universal primer pair for 16S rRNA gene. PCR products were then sequenced, and the results was aligned with the relevant data in NCBI (National Center for Biotechnological Information) web using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Among the five ascidian species, only one species, *Diplosoma virens* that its microbial suspension with sample identity, E1 was molecularly identified. PCR product of its 16S rRNA gene was 1150 bp in length. Alignment of this sequence with the relevant sequences in NCBI using BLAST resulted in the range of similarity of 99.40 – 100% with the 16S rRNA sequences of 17 samples described as *Prochloron* sp., where their hosts were of different species and from different locations, except for sample with accession number of MT 254065. This sample was described as *Prochloron didemni* IMFR-1 in NCBI was originated from *Lissoclinum patella* in Manado Bay. However, the 16S rRNA sequence of E1 sample of this study was 100% similarity with the *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 that was from different species of host and location. Therefore, *Prochloron didemni* was non obligate symbiont microbe that could associate with different ascidian species.

**Keywords:** Ascidian, Microbe, 16S rRNA, *Prochloron* sp.

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis mikroba secara molekuler. Isolasi mikroba dari inang ascidia dilakukan dengan cara memencet jaringan inang yang berisi suspensi warna hijau. Suspensi yang diperoleh, disimpan beku sampai saatnya isolasi DNA. Isolasi DNA dengan prosedur standar, kemudian di amplifikasi menggunakan primer gen 16S rRNA. Produk PCR kemudian disekuens, dan hasil sekuensnya diselaraskan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang ada di di laman NCBI (*National Center for Biotechnological Information*). Dari 5 jenis ascidia yang diisolasi mikrobaanya, ternyata hanya suspensi dari *Diplosoma virens* dengan identitas sampel E1 yang teridentifikasi secara molekuler. Produk PCR ini berukuran 1150 bp yang hasil sekuensnya ketika dicocokkan menggunakan BLAST pada data sejenis di NCBI, mempunyai kemiripan 99,40 – 100% dengan sekuens gen yang sama pada 17 sampel yang terdeskripsikan sebagai *Prochloron* sp. di NCBI dengan inang dan lokasi yang berbeda dengan penelitian ini, kecuali sampel dengan aksesori MT 254065. Sampel ini terdeskripsi sebagai *Prochloron didemni* IMFR-1 yang sampelnya diisolasi dari ascidia *Lissoclinum patella* dari lokasi yang sama dengan penelitian ini. Namun sampel E1 justru mirip 100% dengan *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 yang diisolasi dari inang dan lokasi berbeda. Jadi *Prochloron didemni* merupakan mikroba simbiosis *non obligate* yang dapat berasosiasi dengan jenis-jenis inang yang berbeda.

**Kata Kunci:** Ascidia, Mikroba, 16S rRNA, *Prochloron* sp.

**PENDAHULUAN**

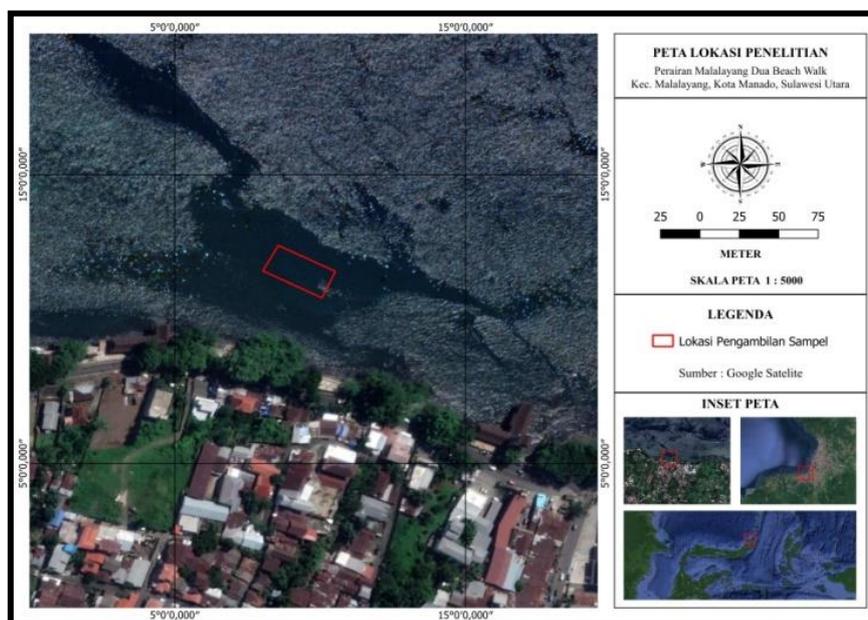
Sebagai negara yang memiliki wilayah perairan lebih besar dibandingkan daratan, Indonesia memiliki biodiversitas laut yang berlimpah. Sulawesi Utara merupakan salah satu provinsi yang terletak di pusat segitiga karang dengan keanekaragaman hayati yang tinggi. Ascidia merupakan salah satu golongan avertebra laut yang sering ditemukan di sekitar terumbu karang dan termasuk dalam kelompok tunikata laut (Untu *et al.*, 2015). Selain ascidia, terdapat juga biota laut lain yang hidup di terumbu karang dan memiliki kemiripan dengan ascidia, yaitu spons (Ngantung *et al.*, 2016). Asosiasi antara ascidia dan mikroba telah banyak dilaporkan (Rumengan *et al.*, 2021). Bentuk tubuh ascidia yang begitu unik memungkinkan mikroba dapat hidup dan tinggal di dalamnya (Behrendt *et al.*, 2012). Avertebrata laut ini biasanya tersebar luas di perairan litoral dan menempel pada substrat keras seperti karang, batu, atau cangkang moluska, serta bertahan hidup dengan cara bersimbiosis dengan mikroba

laut dengan menjalin hubungan timbal balik yang saling menguntungkan.

Jenis-jenis ascidia dan mikroba yang berasosiasi dengannya di perairan Teluk Manado telah dikaji antara lain oleh Malintoi *et al.* (2020), dan mikroba yang berasosiasi dengan ascidia *Lissoclinum patella* oleh Untu *et al.* (2015), dan Rumengan *et al.* (2021). Namun mikroba fotosintetik yang berasosiasi dengan ascidia selain *L. patella*, belum pernah diidentifikasi jenisnya. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi spesies mikroba yang berinteraksi dengan jenis-jenis ascidia yang ditemukan di perairan Malalayang Dua, Teluk Manado, Sulawesi Utara.

**METODE PENELITIAN**

Pengambilan sampel ascidia dilakukan pada bulan Oktober 2022 di pesisir Malalayang Dua, Teluk Manado dengan titik koordinat 1°27'40,69"N 124°47'30,20"E seperti dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta lokasi pengambilan sampel

Pengambilan sampel ascidia dilakukan pada saat air laut surut dengan metode sensus visual atau survei jelajah dengan area yang ditentukan dimana semua Ascidia yang ada di dalam area tersebut diamati jenisnya (Sumilat *et al.*, 2022). Sampel diambil dengan pisau selam kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang sudah diisi air laut setempat, untuk selanjutnya ketika masih segar diisolasi suspensi mikroba dari bagian yang disebut tunik di lapisan bawah permukaan di Laboratorium Bioteknologi dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Ada lima jenis ascidia yang dijumpai menjadi inang mikroba fotosintetik. Kelima jenis ascidia tersebut diidentifikasi secara morfologi (Colin & Arneson, 1995; Malintoi, *et al.*, 2020; dan Sumilat *et al.*, 2022). Selanjutnya isolasi suspensi mikroba dari tunik ascidia, dilakukan sedapat mungkin dengan cara steril dalam ruang tertutup dengan lampu spritus pada suhu ruang sekitar 25°C. Sampel ascidia dibilas dengan air laut steril, kemudian bagian tunik yang berwarna hijau dipencet menggunakan pinset steril. Tetesan yang keluar ditampung dalam ependorf dan disimpan beku sampai analisis DNA dilakukan.

DNA total diisolasi dengan protokol standar *Genomic DNA Mini Kit* (Geneaid) di Laboratorium Biologi Lanjut, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi. Sampel DNA total yang diperoleh dilanjutkan ke tahap PCR (Polymerase Chain Reaction) untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan menggunakan primer forward 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Dalam

setiap reaksi PCR 40 µl berisi MyTaq HS Red Mix 2x (Bioline), masing-masing primer (15 pmol), ddH<sub>2</sub>O, dan 2 µl sampel DNA. Proses PCR dimulai dari proses denaturasi awal pada suhu 95°C dan selama 3 menit kemudian dilanjutkan 35 siklus dengan suhu 95°C dan 50°C untuk annealing, serta 72°C untuk pemanjangan rantai DNA. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dengan metode standar menggunakan gel agarose 0,8% yang mengandung etidium bromide menggunakan 100 volt selama 30 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat dan diletakkan di atas UV transilluminator. Hasil yang diperoleh didokumentasikan menggunakan kamera.

Setelah itu, DNA hasil amplifikasi disebut sebagai produk PCR, dikemas bersama-sama pasangan primer yang digunakan, info panjang DNA dan suhu *annealing* pada saat PCR didata, kemudian dikirim ke First Base C.O. (Malaysia) untuk proses sekuensing. Hasil sekuensing yang diperoleh berupa kromatogram yang kemudian disunting menggunakan Geneious Prime v2023.1.2. untuk mendapatkan sekuens DNA. Sekuens DNA ini dijadikan templat untuk dicocokkan dengan data yang tersedia di laman NCBI (National Center for Biotechnology Information) menggunakan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Piranti lunak BLAST ini memunculkan kemiripan tertinggi dari sekuens DNA sampel yang kemudian dideskripsikan dan diuraikan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

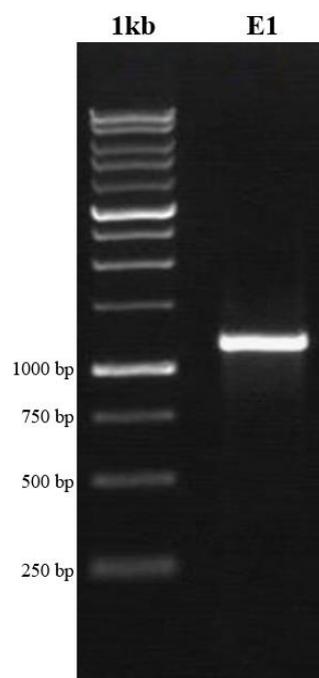
Hasil identifikasi secara morfologi terhadap sampel-sampel ascidia, ditemukan ada 5 jenis ascidia yang dalam tuniknya ada suspensi hijau yaitu *Polycarpa aurata*, *Atrium robustum*,

*Eudistoma reginum*, *Diplosoma virens* dan *Didemnum molle*. Dari ke lima sampel suspensi mikroba yang diperoleh dari setiap jenis ascidia ini, ternyata hanya suspensi dari satu jenis ascidia yaitu *D. virens*, dengan identitas sampel E1 yang DNA sampelnya dapat teramplifikasi dengan 16S rRNA. Produk PCR sampel ini dapat dilihat pada Gambar 2 yang memperlihatkan pita elektroforesis E1 berada pada ukuran panjang 1150 bp, yang menunjukkan ukuran gen 16S rRNA.

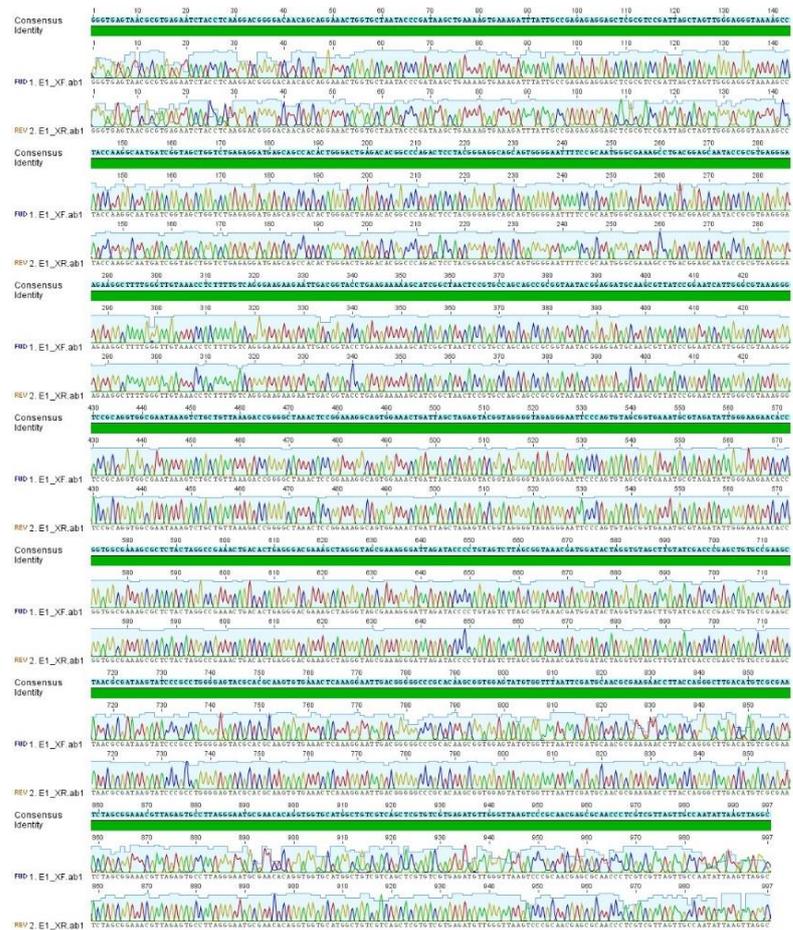
Kromatogram hasil penjajaran (*alignment*) sekuen parsial 16S rRNA sampel mikroba ditunjukkan pada Gambar 3. Kromatogram tersebut memperlihatkan bagian-bagian yang dinamakan "consensus", *FWD*E1\_XF.ab1 dan *REV*E1\_XR.ab1. *Consensus* merupakan hasil penjajaran sekuen dua arah gen 16S rRNA dari sampel E1. *REV*E1\_XR.ab1 adalah sekuen yang disekuensing menggunakan primer reverse sedangkan *FWD*E1\_XF.ab1 adalah sekuen 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*X1\_XR.ab1. Puncak yang baik ditunjukkan dengan ciri-ciri yaitu, terpisah satu sama lain dan tidak saling tumpang tindih. Puncak tersebut berada pada bagian *FWD* E1\_XF.ab1.

Sekuens 16S rRNA dari sampel yang diperoleh dari hasil sekuensing kemudian dibuat dalam bentuk format FASTA (Gambar 4) untuk memudahkan pemindahan teks antar-platform penyunting sekuen DNA ke pencari sekuen database GenBank. Sekuens DNA dalam format FASTA dimasukkan sebagai *query* dalam BLAST pada GenBank NCBI yang bertujuan untuk mengetahui data mikroba apa saja yang memiliki kesamaan tertinggi dengan sampel mikroba.



Gambar 2. Hasil elektroforesis terhadap produk PCR dari sampel E1



Gambar 3. Kromatogram sekuens 16S rRNA produk PCR dari sampel E1

```
GGGTGAGTAACCGGTGAGAATCTACCTCAAGGACGGGGACAACAGCAGGAAACT
GGTGCTAATACCCGATAAGCTGAAAAGTGAAAGATTTATTGCCGAGAGAGGAGC
TCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGGAGGGTAAAAGCCTACCAAGCAATGATCGGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGC
AATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTTTTGGGTTGTAAACCTCTTTTGTACAGGGAAG
AAGAATTGACGGTACCTGAAGAAAAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGTCCG
CAGGTGGCGAATAAAGTCTGCTGTTAAAGACCGGGGCTAAACTCCGGAAAGGCA
GTGGAAACTGATTAGCTAGAGTACGGTAGGGGTAGAGGGAATCCCAGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGG
CCGAAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCC
CTGTAGTCTTAGCGGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGCTTGTATCGACCCGAGC
TGTGCCGAAGCTAACCGGATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGTCGCGAATCTAGCGG
AAACGTTAGAGTGCCTTAGGGAATGCGAACACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCA
GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTGT
AGTTGCCAATATTAAGTTAGGC
```

Gambar 4. Bentuk fasta sekuens 16S rRNA sampel E1

Ostell *et al.* (2001) menyatakan bahwa format FASTA merupakan barisan definisi yang menunjukkan karakter dari sekuens yang dapat digunakan untuk input dari sebuah variasi program-program analisis. Hal ini dimanfaatkan untuk mengetahui informasi mikroba fotosintetik apa saja yang memiliki tingkat kesamaan tertinggi dengan sampel E1 dan format ini diakses menggunakan BLAST pada GenBank NCBI. Format FASTA ini juga memudahkan pemindahan teks antar-platform penyunting sekuens DNA yang akurat ke pencarian sekuens database GenBank pada NCBI.

Hasil sekuens ini setelah dicocokkan dengan data sejenis di laman NCBI dengan menggunakan BLAST dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil sekuens gen 16S rRNA sampel E1 terkonfirmasi memiliki kemiripan pada kisaran 99,40 – 100 % dengan sekuens gen yang sama dari 17 sampel mikroba yang tersedia di NCBI. Semua sekuens gen 16S rRNA ini dari sampel-sampel *Prochloron* sp. kebanyakan yang tidak dikultur. Sedangkan, kemiripan dengan sampel dari

Teluk Manado dikoleksi dari ascidia *Lissoclinum patella* yang didepositkan oleh I F M Rumengan dengan nomor akses MT254065 hanya 99,40%. Sampel *Prochloron* yang berasal dari *L. patella* dan diambil dari lokasi yang sama juga dilaporkan oleh Rumengan *et al.* (2021), bahwa ukuran gen 16S rRNA 1152 bp sampel mereka sangat mirip (99,8-99,9%) dengan *Prochloron* sp. dari *L. patella* dari lokasi lain dengan nomor akses X63141 dan DQ357952) (Urbach *et al.*, 1992; Münchhoff *et al.*, 2007).

Selain menggunakan sekuens gen 16S rRNA, identifikasi molekuler *Prochloron* sp. juga dapat dilakukan dengan menggunakan sekuens gen *caochlorophyll A oxygenase* (Tomitani *et al.*, 1999; Rumengan *et al.*, 2021). Hal yang menarik dari penelitian ini, bahwa sampel E1 yang berisi suspensi mikroba yang berasosiasi dengan ascidia *D. virens* memiliki sekuens gen 16S rRNA yang memiliki kemiripan tertinggi 100% dengan *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 16S rRNA. dengan nomor akses KU511267 (Lin *et al.*, 2016).

Tabel 1. Kemiripan sekuens 16S rRNA sampel E1 dengan mikroba yang terdata di NCBI

No	Nomor Akses	Jenis Mikroba	Kemiripan
1.	KU511267	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone E11-016 16S ribosomal RNA	100 %
2.	KU511265	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone Okinawa 16S ribosomal RNA.	99,80 %
3.	DQ357961	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone NA-112 16S ribosomal RNA	99,80 %
4.	KU511266	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone LV5 16S ribosomal RNA	99,70 %
5.	DQ357969	<i>Uncultured Prochloron</i> sp, clone LI-88 16S ribosomal RNA	99,70 %
6.	DQ357968	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone AO-101 16S ribosomal RNA	99,60 %
7.	DQ357963	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone LI-85 16S ribosomal RNA	99,60 %
8.	KU511264	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone E11-036 16S ribosomal RNA	99,50 %
9.	AB723719	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. gene for 16S ribosomal RNA partial	99,50 %
10.	DQ357966	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone NA-107 16S ribosomal RNA	99,50 %
11.	DQ357962	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone TA-113 16S ribosomal RNA	99,50 %
12.	DQ357959	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone NA-109 16S ribosomal RNA	99,50 %
13.	DQ357954	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone AK-121 16S ribosomal RNA	99,50 %
14.	DQ357952	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone AK-125 16S ribosomal RNA	99,50 %
15.	X63141	<i>Prochloron</i> sp. gene for 16S ribosomal RNA	99,50 %
16.	MT254065	<i>Prochloron didemni</i> IMFR-1 16S ribosomal RNA gene partials	99,40 %
17.	KU511263	<i>Uncultured Prochloron</i> sp. clone E11-040 16S ribosomal RNA	99,40 %

**Uncultured Prochloron sp. clone E11-016 16S ribosomal RNA gene, partial seq**  
 Sequence ID: [KU511267.1](#) Length: 1590 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1590 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Prev](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2937 bits(1590)	0.0	1590/1590(100%)	0/1590(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAACTCTTCGGAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTA			60
Sbjct 1	GTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGAACTCTTCGGAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTA			60
Query 61	ACGCGTGAGAATCTACCTCAAGGACGGGGACAACAGCAGGAAAACGGTCTAATACCCGA			120
Sbjct 61	ACGCGTGAGAATCTACCTCAAGGACGGGGACAACAGCAGGAAAACGGTCTAATACCCGA			120
Query 121	TAAGCTGAAAAGTGAAGATTTATTGCCGAGAGAGGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTG			180
Sbjct 121	TAAGCTGAAAAGTGAAGATTTATTGCCGAGAGAGGAGCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTG			180
Query 181	GGAGGGTAAAAGCCTACCAAGGCAATGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCAC			240
Sbjct 181	GGAGGGTAAAAGCCTACCAAGGCAATGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCAC			240
Query 241	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAA			300
Sbjct 241	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTCCGCAA			300
Query 301	TGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTTTGGGTTGTA AAC			360
Sbjct 301	TGGCGAAAAGCCTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTTTGGGTTGTA AAC			360
Query 361	TCTTTTGT CAGGGAAGAAGAATTGACGGTACCTGAAGAAAAGCATCGGCTAACTCCGTG			420
Sbjct 361	TCTTTTGT CAGGGAAGAAGAATTGACGGTACCTGAAGAAAAGCATCGGCTAACTCCGTG			420
Query 421	CCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGGG			480
Sbjct 421	CCAGCAGCCGCGGTAAACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGGG			480
Query 481	TCCCGAGGTGGCGAATAAAGTCTGCTGTTAAAGACCGGGCTAAACTCCGGAAAGGCAGT			540
Sbjct 481	TCCCGAGGTGGCGAATAAAGTCTGCTGTTAAAGACCGGGCTAAACTCCGGAAAGGCAGT			540
Query 541	GGAAACTGATTAGCTAGAGTACGGTAGGGGTAGAGGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAAT			600
Sbjct 541	GGAAACTGATTAGCTAGAGTACGGTAGGGGTAGAGGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAAT			600
Query 601	GCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGGCCGAAACTGACACT			660
Sbjct 601	GCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTAGGCCGAAACTGACACT			660
Query 661	GAGGGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCTTAGCGGTAAAC			720

Gambar 5. Penyelarasan hasil sekuens gen 16S rRNA sampel mikroba dengan data pada NCBI dengan nomor akses: KU511267 (Lin *et al.*, 2016)

Perbandingan data sekuens mikroba dari penelitian ini dengan sekuens gen yang sama dari spesies ascidia yang berbeda seperti *L. patella* dari lokasi yang sama atau berbeda, menunjukkan perbedaan hanya kurang dari 1% (Tabel 1), menunjukkan bahwa urutan nukleotida gen 16S rRNA cukup terkonservasi. Bahkan kemiripan 100% sekuens gen tersebut dari mikroba yang berasosiasi dengan *D. virens* menunjukkan bahwa

Jumlah basa nukleotida *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 16S ribosomal RNA yang sama atau mirip dengan basa nukleotida sampel E1 adalah 1590 dari 1590 (Gambar 5). Sehingga dapat dikatakan hasil sekuens sampel mikroba dan *Uncultured Prochloron* sp.

*Prochloron* dikategorikan sebagai simbion yang *non obligate*. Konfirmasi mengenai fenomena ini perlu dilakukan dengan mengeksplor lebih lanjut keberadaannya pada jenis ascidia berbeda, termasuk pada ke empat jenis ascidia dalam penelitian ini. Belum teridentifikasinya mikroba yang berasosiasi dengan jenis-jenis ascidia ini tidak menutup kemungkinan ditemukannya asosiasi mikroba dengan jenis ascidia tersebut pada penelitian lain kedepannya. clone E11-016 16S ribosomal RNA tidak memiliki perbedaan sama sekali. Tidak adanya perbedaan tersebut ditandai dengan adanya garis tegak lurus sebagai penanda kesamaan basa pada kedua sekuens.

### Identifikasi Mikroba yang Berasosiasi dengan *Ascidia Diplosoma virens*

Berdasarkan data DNA yang ada, sebagian besar mikroba yang mirip dengan sampel mikroba dari ascidia *D. virens* didominasi oleh Sianobakteri. Hal ini berarti sesuai dengan pendapat 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 (Untu *et al.*, 2015).

Sampel mikroba E1 memiliki tingkat kemiripan tertinggi (100%) dengan jenis *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 16S rRNA dengan kode akses KU 511267 dari sampel mikroba yang dikoleksi dari Papua New Guinea (PNG) (Lin *et al.*, 2016). Melalui semua tahap penelitian ternyata dari sekian sampel ascidia yang didapatkan hanya satu jenis ascidia yang teridentifikasi berasosiasi dengan mikroba fotosintetik yaitu *D. virens*. Bentuk asosiasi ascidia *D. virens* dengan mikroba fotosintetik *Prochloron* sp. diasumsikan karena proses distribusi “horizontal transmission” dengan faktor pendukung seperti morfologi atau cara makan dari ascidiacea yang bersifat “filter feeder”. Mikroba fotosintetik ini hidup dengan membutuhkan intensitas cahaya matahari yang cukup di bawah laut pada kedalaman ± 5 meter dari dasar laut.

### KESIMPULAN

Hasil sekuens gen 16S rRNA menunjukkan ukuran panjang DNA 1150 bp. Setelah diselaraskan dengan data yang tersedia di dalam NCBI GenBank menggunakan BLAST ternyata sekuens

gen 16S rRNA sampel E1 dari ascidia *D. virens* menunjukkan tingkat kemiripan tertinggi yaitu 100% dengan *Uncultured Prochloron* sp. clone E11-016 dengan nomor akses KU511267. Sementara itu, tingkat kemiripan dengan sekuens gen yang sama dengan identitas MT 254065 yang didepositkan oleh IFMR yang berasal dari mikroba *P. didemni* yang diisolasi dari *L. patella* dari lokasi yang sama justru hanya 99,40%.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ngantung, A., Bara, R., A., Sumilat, D. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri dari Spons *Dictyonella funicularis* dan *Phyllospongia lamellosa* yang Diambil pada Perairan Bunaken. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 4(2), 10-16.
- Behrendt, L., Larkum, A.W.D., Trampe, E., Norman, A., Sorensen, S. J., Kuhl, M. 2012. Microbial Diversity of Biofilm Communities in Microniches Associated with the Didemnid Ascidian *Lissoclinum patella*. *The ISME Journal*, 6, 1222-1237.
- Colin, P.L., Arneson, C. 1995. Tropical Pacific Invertebrates. A Field Guide to the Marine Invertebrates Occurring on Tropical Pacific Coral Reefs, Seagrass Beds and Mangroves. Coral Reef Press. Beverly Hills, CA, USA. p 296.
- Hirose, E., Turon, X., Lopez-Legentil, S., Erwin, P.M., Hirose, M. 2012. First Records of Didemnid Ascidiaceans Harboring *Prochloron* from Caribbean Panama: Genetic Relationships Between Caribbean And Pacific Photosymbionts And Host Ascidiaceans. *Systematics and Biodiversity*, 10(4), 435-445.
- Lin, Z., Torres, J.P., Tianero, M.D., Kwan, J. C., Schmidt, E. W. 2016. Origin of Chemical Diversity in *Prochloron*-Tunicate Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(12), 3450–3460.
- Malintoi, A., Rumengan I.F.M., Roeroe, K. A., Warouw, V., Rondonuwu, A.R.,

- Ompi, M. 2020. Komunitas Ascidia di Pesisir Malalayang Dua, Teluk Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 8(1), 39-46.
- Münchhoff, J., Hirose, E., Maruyama, T., Sunairi, M., Burns, B. P., Neilan, B. A. 2007. Host Specificity and Phylogeography of the Prochlorophyte Prochloron sp., an Obligate Symbiont in Didemnid Ascidians. *Environmental Microbiology*, 9(4), 890-899.
- Ostell, J.M., Wheelan, S.J., Kans, J.A. 2001. The NCBI Data Model. *Methods of Biochemical Analysis*, 43, 19-43.
- Rumengan, I.F.M., Roring, V.I.Y., Haedar, J.R., Siby, M.S., Luntungan, H.A., Kolodam, J.B., Uria, R.A., Wakimoto, T. 2021. Ascidian-Associated Photosymbionts from Manado, Indonesia: Secondary Metabolites, Bioactivity Simulation, and Biosynthetic Insight. *Symbiosis*, 84(1),1-12.
- Sumilat, D. A., Palit, C., Opa, S. L., Ompi, M,. 2022. Ascidia dari Sulawesi Utara. Bandung. 74 hal.
- Tomitani, A., Okada, K., Miyashita, H., Matthijs, H.C., Ohno, T., Tanaka, A. 1999. Chlorophyll b and Phycobilins in the Common Ancestor of Cyanobacteria and Chloroplasts. *Nature*, 400(6740),159-162.
- Untu, P., Rumengan, I.F.M., Ginting, E. 2015. Identifikasi Mikroba yang Koeksis dengan Ascidia *Lissoclinum patella* Menggunakan Sekuens Gen 16S rRNA. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 3(2), 23-33.
- Urbach, E, Robertson L.D, Chisholm. W.S. 1992. Multiple Evolutionary Origins of Prochlorophytes within the Cyanobacterial Radiation. *Nature*, 355(6357), 267-269.