

ISOLASI DAN AMPLIFIKASI GEN 16S rRNA ISOLAT MIKROBA ASOSIATIF
PADA ALGA MERAH *Kappaphycus alvarezii* DARI PERAIRAN DESA BELANG,
KABUPATEN MINAHASA TENGGARA, SULAWESI UTARA

(Isolation and amplification of 16S rRNA gen of Associated Microbial isolates in Red
Algae *Kappaphycus alvarezii* from Belang, Southeast Minahasa Regency, North
Sulawesi)

Letha L. Wantania¹, Stenly Wullur^{2*}, Elvi L. Ginting², Desy M. H. Mantiri²,
Suzanne L. Undap², Deiske A. Sumilat², Grevo S. Gerung²

¹Program Studi Magister Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Sam Ratulangi, Manado 95115. louisletha@gmail.com

*Author Correspondent: e-mail: stenlywullur@unsrat.ac.id

² Staff Pengajar Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam
Ratulangi Manado

ABSTRACT

This study aims to obtain isolates and amplify the associative bacterial 16SrRNA gene in *K. alvarezii* algae. The *K. alvarezii* algae was collected from seaweed cultivation area in Belang, Southeast Minahasa, North Sulawesi. Associative bacteria were sampled from *K. alvarezii* algae, grown in Nutrient Agar and separated based on their morphological characteristics. Each isolates were extracted their DNA genome and the 16S rRNA gene of each isolate was amplified using PCR. Eight associative bacterial from *K. alvarezii* algae were successfully isolated based on morphological characteristics which were dominated by round shape, smooth edges, convex elevation, and white color of the isolates. The results of genomic DNA extraction from each of these isolates were successfully used as templates to amplify the 16s rRNA gene.

Key word: *Bacteria, Kappaphycus alvarezii, Taxsonomy, 16S rRNA*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat dan mengamplifikasi gen 16SrRNA bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii*. Metode penelitian diawali dengan pengambilan sampel alga *K. alvarezii* di lokasi pembudidayaan rumput laut di desa Belang, Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara. Selanjutnya, bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii* tersebut ditumbuhkan dalam media *Nutrient Agar*, isolat yang tumbuh kemudian dipisahkan berdasarkan karakteristik morfologinya. dan gen 16S rRNA masing-masing isolat diamplifikasi menggunakan PCR. Delapan isolat bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii* berhasil diisolasi dengan karakteristik morfologi berbeda yang didominasi dengan bentuk round, tepian smooth, elevasi convex, dan warna putih. Hasil ekstraksi DNA genom dari masing-masing isolat tersebut berhasil digunakan sebagai template untuk mengamplifikasi gen 16s rRNA.

Kata Kunci: *Bakteri, Kappaphycus alvarezii, Taksonomi, 16S rRNA*

PENDAHULUAN

Alga laut atau yang lebih dikenal dengan sebutan rumput laut merupakan salah satu sumberdaya hayati yang melimpah di perairan Indonesia. Rumput laut ini merupakan tumbuhan

yang tidak memiliki batang, akar, dan daun yang sebenarnya. Berbagai manfaat mulai dari peranan ekologis dalam produktivitas primer di laut hingga potensi ekonomi sebagai bahan baku dalam industri dan kesehatan menjadi

daya tarik dari komoditas ini (Dawes, 1998; Dahuri, 2015). Dewasa ini, rumput laut digunakan dalam industri makanan, pupuk tanaman, bahan pembuatan kertas, cat, bahan kosmetik, produksi hidrokoloid seperti agar dan alginat, serat, bahan obat-obatan seperti antibiotik, antikoagulan, antihipertensi, pengurangan kolesterol, dan insektisida (Chen & Duan, 2000; Gerung, 2004).

Dalam beberapa tahun terakhir, alga dan produk turunannya telah menarik perhatian dunia industri. Sebagai mikroba asosiatif, peran bakteri terhadap alga dapat juga bersifat positif, seperti dapat membantu supply nutrisi untuk pertumbuhan alga serta sebagai mikroorganisme yang bersifat defensif terhadap penyakit dan penempelan organisme pengganggu (Egan et al., 2012). Selain memiliki dampak positif, mikroorganisme seperti bakteri juga dapat memberi dampak negatif. Interaksi alga dengan mikroba asosiatif sering dianggap sebagai sumber penyakit ataupun kontaminan dalam proses produksi hingga komersialisasi alga dan turunannya (Ramanan et al., 2015).

Kappaphycus alvarezii merupakan salah satu jenis alga yang banyak dibudidayakan dan mendominasi ekspor di Indonesia. Alga ini dapat menghasilkan karagenan yang memiliki beragam manfaat di bidang industri (Failu et al., 2016). Pada beberapa penelitian membuktikan bahwa bakteri asosiasi alga merah *K.alvarezii* memiliki potensi sebagai bahan antibakteri (Naid et al., 2013) dan salah satu sumber pigmen alami yang berasal dari laut (Sahara et al., 2013).

Penelitian mengenai bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut *K. alvarezii* selalu dikaitkan dengan bakteri patogen. Penelitian mengenai jenis-jenis bakteri yang berasosiasi dengan alga *K. alvarezii* belum banyak dilakukan terutama di berbagai lokasi budidaya lokal Sulawesi Utara.

METODE PENELITIAN

Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di lokasi pembudidayaan rumput laut yang terletak di perairan desa Belang, Kabupaten Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara pada bulan November, 2018. Lokasi dan analisis sampel dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Isolasi dan Kultur Bakteri

Sampel alga *K. alvarezii* yang telah diperoleh dibilas dengan menggunakan air laut steril dan digerus di dalam ependorf. Setelah itu, dilakukan pengenceran hingga 10⁻⁴ dan diinokulasi ke dalam media Nutrient Agar. Sampel yang telah diinokulasi kemudian ditumbuhkan pada suhu 37°C selama ±24-48 jam. Isolat bakteri yang telah bertumbuh dikarakterisasi morfologinya mulai dari ukuran, bentuk, warna, dan elevasi. Isolat yang diperoleh kemudian dipisahkan dalam media nutrient agar baru untuk dijadikan stok dan untuk analisis selanjutnya.

Amplifikasi Gen 16S rRNA

Proses amplifikasi Gen 16S rRNA diawali dengan proses isolasi DNA bakteri. Pada proses isolasi DNA, isolat bakteri yang telah diperoleh dikultur ke dalam media Nutrient Broth. Nutrient broth yang telah ditumbuhi bakteri kemudian disentrifus pada suhu 4°C selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm sebanyak 6 ml. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang hingga yang tertinggal hanya pellet (Sari et al., 2013). Pellet hasil sentrifus pada tahap ini merupakan isolat bakteri yang kemudian digunakan untuk Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit DNeasy Blood and Tissue (bukan bakteri). Tahapan proses isolasi DNA berpedoman pada prosedur pabrikan www.qiagen.com. Isolat bakteri yang telah berada dalam tube ditambahkan dengan buffer ATL dan

proteinase K lalu divortex dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 1 jam (Sampel divortex setiap 15 menit selama waktu inkubasi). Setelah 1 jam, tambahkan buffer AL dan vortex kemudian inkubasi kembali pada suhu 70°C selama 10 menit. Lebih lanjut tambahkan etanol pada sampel isolat bakteri dan divortex kemudian larutan dipindahkan pada DNeasy Mini Spin Column yang berada di atas 2 ml collection tube. Sentrifugasi tube yang berisi larutan pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit dan buang cairan di bagian bawah tube. Tahap selanjutnya dilakukan dengan menambahkan buffer AW 1 dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit lalu cairan dibuang. Tambahkan buffer AW 2 dan sentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit dan buang cairan yang berada di bagian bawah tube. Pindahkan DNeasy Mini Spin Column ke atas elution tube. Setelah itu tambahkan buffer AE pada bagian tengah DNeasy Mini Spin Column dan inkubasi pada suhu ruangan selama 1 menit lalu kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

Proses selanjutnya adalah proses amplifikasi gen 16S rRNA. Proses amplifikasi gen dilakukan menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR). Hal pertama yang perlu dilakukan pada proses amplifikasi adalah membuat campuran reaksi yang diisi dalam tube khusus untuk mesin PCR. Campuran tersebut antara lain 8,5

µl Rnase-free water (ddH₂O), 12,5 µl 2x Top Taq Master Mix, 2,5 µl 10x coralload concentrate, 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, dan 2 µl DNA template. Primer yang akan digunakan pada bakteri asosiasi alga adalah primer universal 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') untuk Primer forward dan 1492 R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') untuk primer reverse. Proses ini diawali dengan predenaturasi 95°C selama 6 menit selanjutnya denaturasi 95°C selama 30 detik, penempelan 52°C selama 30 detik, dan elongasi 72°C selama 30 detik. Pada tahap denaturasi hingga elongasi dilakukan sebanyak 35 siklus dan 1 siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Keberhasilan dari proses isolasi DNA hingga amplifikasi gen dapat dilihat menggunakan teknik elektroforesis gel. Gel agarose hasil proses elektroforesis kemudian diletakkan pada alat UV-transiluminator untuk melihat ada atau tidaknya pita DNA target.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada saat pengambilan sampel di lokasi pembudidayaan rumput laut desa Belang, diperoleh 2 sampel alga *K. alvarezii* dengan warna berbeda. Kedua warna dari alga tersebut adalah hijau yang lebih dikenal dengan nama sabai oleh masyarakat pembudidaya dan warna coklat yang lebih dikenal dengan nama cottonii (Gambar 1).



Gambar 1. Alga *Kappaphycus alvarezii* dari Lokasi Pembudidayaan di Desa Belang

Berdasarkan pengamatan dengan membandingkan morfologi dari

alga dengan buku identifikasi (Trono, 1988; Tanji, 2013), ciri-ciri morfologi yang

diperoleh dari alga *K. alvarezii* adalah talus yang berbentuk silinder dan kokoh, berwarna hijau dan coklat, memiliki percabangan terbuka, agak jarang-jarang dan tidak beraturan. Panjang cabang berkurang pada setiap tingkat percabangan. Cabang terminal berbentuk runcing membulat dengan tekstur permukaan yang halus dan cartilaginous. Meskipun memiliki warna yang berbeda, namun *K.alvarezii* dengan warna coklat dan hijau mengandung pigmen yang sama yaitu zeaxantin dan klorofil (Fretes, 2012).

Bakteri yang berasosiasi dari kedua sampel alga *K. alvarezii* ini

ditumbuhkan pada media NA. Sampel yang telah digerus di dalam ependorf dan telah diencerkan dengan pengenceran bertingkat ditumbuhkan pada media NA dengan cara di sapukan di permukaan media agar yang ditandai dengan tumbuhnya koloni bakteri pada media. Pengenceran sampel ini bertujuan untuk memperoleh isolat murni bakteri. Setiap koloni bakteri yang tumbuh dipisahkan berdasarkan warna, ukuran dan bentuk koloni kemudian diisolasi dengan menumbuhkannya pada media yang sama.

Tabel 1. Karakteristik isolat bakteri asosiasi alga *K. alvarezii* berwarna Hijau (Sabai)

Kode Isolat	Karakteristik Isolat				
	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna	Ukuran
S1	Serabut	<i>Irregular</i>	Datar	Putih	8 mm
S2	Bundar	<i>Entire</i>	Cembung	Putih	3 mm
S3	Bundar	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>	Putih	8 mm

Tabel 2. Karakteristik isolat bakteri asosiasi alga *K. alvarezii* berwarna Coklat (cottonii)

Kode Isolat	Karakteristik Isolat				
	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna	Ukuran
C1	Bundar	<i>Entire</i>	Cembung	Kuning	1 mm
C2	Bundar	<i>Entire</i>	Cembung	Putih Susu	8 mm
C3	Bundar	<i>Entire</i>	Datar	Kuning Susu	11 mm
C4	Bundar	<i>Entire</i>	Cembung	Putih	2 mm
C5	Bundar	<i>Lobate</i>	<i>Raised</i>	Abu-abu	21 mm

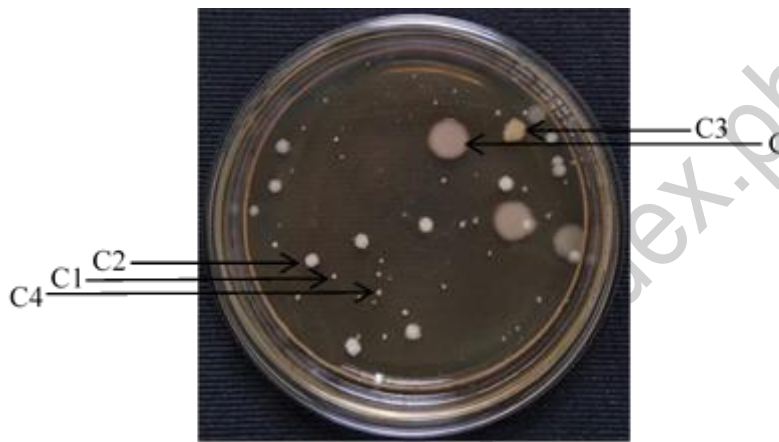
Karakteristik dari bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii* dari lokasi budidaya rumput laut di Perairan Desa Belang telah diamati secara makroskopis dengan mengacu pada Leboffe (2012). Morfologi isolat bakteri asosiasi alga *K. alvarezii* yang berwarna hijau (Sabai) dapat dilihat pada Tabel 1 dan morfologi isolat bakteri asosiasi alga *K. alvarezii* yang berwarna coklat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi diperoleh 8 isolat bakteri, masing-masing 3 isolat dari *K. alvarezii* berwarna hijau dan 5 isolat dari *K. alvarezii* berwarna coklat. Tabel 1 menunjukkan isolat bakteri S1, S2, dan S3 memiliki warna dominan putih dengan elevasi yang beragam, dan didominasi bentuk bundar dengan tepian entire (sangat rata) yang memiliki ukuran 3 dan 8 mm. Pada Tabel 2, isolat C1, C2, C3, C4, dan C5 memiliki bentuk yang serupa yaitu bundar dengan dominasi tepian entire dan satu isolat memiliki tepian lobate.

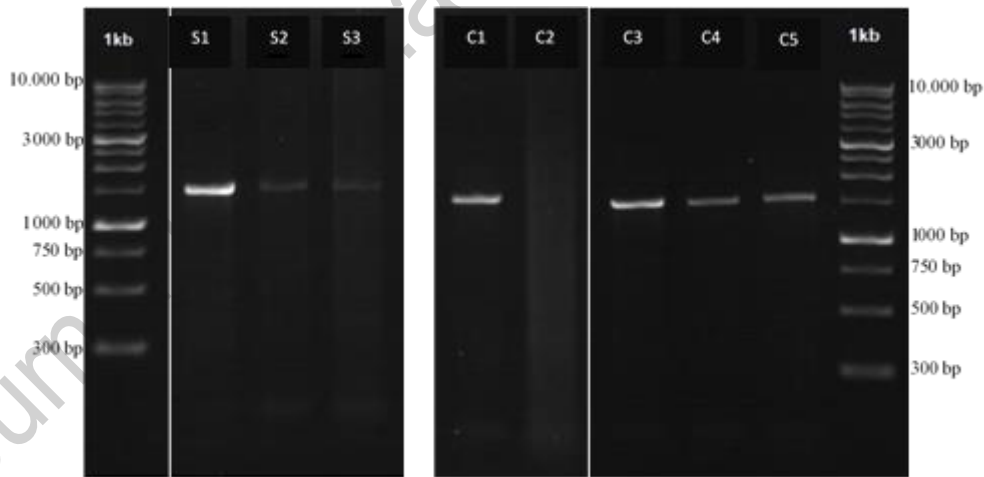
Tiga dari isolat bakteri asosiasi *K. alvarezii* yang berwarna hijau ini memiliki elevasi cembung dan dua diantaranya memiliki elevasi datar serta raised (sedikit menonjol). Kelima isolat bakteri ini memiliki warna yang beragam dengan ukuran yang beragam pula mulai dari 1 mm hingga 21 mm. Hal ini disebabkan karena kepadatan dan kerapatan sel bakteri serta ketersediaan nutrisi dalam media pertumbuhan (Wiley et al., 2008). Elevasi koloni dari isolat bakteri asosiasi *K. alvarezii* disajikan pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Isolat Bakteri pada alga *K. alvarezii* yang berwarna hijau (Sabai)



Gambar 3. Isolat Bakteri pada alga *K. alvarezii* yang berwarna Coklat (Cottonii)



Gambar 4. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA dari bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii*

Hasil ekstraksi DNA genom pada isolat bakteri asosiasi *K. alvarezii* yang digunakan sebagai DNA template dalam proses amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 8 F dan 1492 R. Hasil amplifikasi gen yang divisualisasi dengan menggunakan UV-

Transiluminator disajikan pada Gambar 4.

Berdasarkan gambar diatas, tampak bahwa terdapat 7 pita DNA pada lintasan sampel S1, S2, S3, C1, C3, C4, dan C5 yang telah berhasil di amplifikasi dengan posisi panjang

amplicon sekitar 1500 bp sedangkan pada lintasan sampel C2 tidak tampak pita DNA. Posisi panjang amplicon tersebut sesuai dengan posisi panjang basa gen 16S rRNA yang digunakan sebagai primer universal dalam identifikasi mikroorganisme (Clarridge, 2004). Sampel S1 merupakan sampel yang memiliki tampilan pita paling tebal dan jelas diantar enam pita lainnya. Pada sampel C1, C3, C4, dan C5 tampak pita yang terlihat jelas namun kurang tebal jika dibandingkan dengan pita S1. Pada sampel S2 dan S3, tampilan pita yang terlihat sedikit samar. Salah satu faktor yang mempengaruhi tampilan pada visualisasi elektroforesis berasal dari kondisi sampel DNA tersebut. Selain itu faktor lain yang mempengaruhi tampilan pita diduga diakibatkan oleh jumlah/kuantitas sampel koloni bakteri yang digunakan kurang cukup memadai pada saat isolasi DNA ataupun kurang tepatnya primer yang digunakan (Yilmaz et al., 2012; Dwiwitno, 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh dalam penelitian ini, maka dapat disimpulkan:

1. Hasil analisis morfologi bakteri yang hidup berasosiasi dengan alga *K. alvarezii* di lokasi pembudidayaan rumput laut di Perairan Desa Belang diperoleh 8 isolat bakteri dengan karakteristik morfologi berbeda yang didominasi dengan bentuk round, tepian smooth, elevasi convex, dan warna putih.
2. Gen 16s RNA sebagai gen target untuk analisis DNA taksonomi bakteri berhasil diamplifikasi sebanyak 7 dari 8 isolat bakteri asosiatif pada alga *K. alvarezii*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi,

Republik Indonesia, dan Pusat Penelitian Oceanografi LIPI yang telah membiayai penelitian ini dalam skema Penelitian Pengembangan Unggulan Perguruan Tinggi (PPUPT) tahun anggaran 2018, dan Penelitian Unggulan Strategis Nasional tahun anggaran 2018, serta program LIPI khususnya Coremap-CTI dalam Drive Research Grant 2018 dan Demand Driven Research Fund 2019 dengan ketua tim peneliti Dr. Joshian Schaduw yang telah banyak mengambil bagian dalam terselenggaranya kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, K. Z. & Duan, Y., 2000. 'Competitiveness of Canadian agri-food exports against competitors in asia: 1980-97', *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*, 11(4), 19.
- Dahuri, R., Rais, J. & Ginting, S. P., 2001. *Pengelolaan Sumber Daya Wilayah Pesisir dan Lautan Secara Terpadu*. Jakarta: Pradnya Paramita.
- Dawes, C. J., 1998. *Marine Botani Second Edition*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Dwiwitno, D., 2010. 'Pathogenic bacteria, fish, DNA molecular, PCR', *Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 5(2).
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S. & Thomas, T., 2013. 'The seaweed holobiont: understanding seaweed-bacteria interactions', *FEMS Microbiology Review*, 462-476.
- Failu, I., Supriyono, E. & Suseno, H., 2016. 'Peningkatan Kualitas Kagenan Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Dengan Metode Budidaya Keranjang Jaring', *Jurnal akuakultur Indonesia*. 15(2), 123-124.
- Fretes, H. D., 2012. Studi komposisi, kandungan pigmen, fotostabilitas

- dan termostabilitas serta analisis produk degradasi ekstrak kasar pigmen alga merah *Kappaphycus alvarezii* doty varian merah, coklat dan hijau. THESIS. Universitas Kristen Satya Wacana.
- Gerung, S.G., 2004. Biodiversity of Indonesian seaweed. *Dalam Marine Science into the New Millenium: New Perspectives and Challenges, edited by Phang, S.M., Ho, S.C., Chong, V.C., Mokhtar, N. & Ooi, J.L.S.* Kuala Lumpur: University of Malaya Maritime Research Centre, 41-54.
- Leboffe, M. J. & Pierce, B. E .,2012. *Brief Microbiology. Laboratory Theory & Application 2nd Edition.* Englewood: Morton Publishing.
- Naid, T., Kasim, S., Marzuki, A. & Sumarheni., 2013. 'Produksi antibiotika secara fermentasi dari biakan mikroorganisme simbion rumput laut *Eucheuma cottoni*', *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 7(3), 61-68.
- Ramanan, R., Kim B. H., Cho, D. H., Oh, H. M. & Kim, H. S., 2015. 'Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications', *Biotechnology Advance, Elsevier*, 16.
- Sahara, F. N. I., Radjasa, O. K. & Supriyantini, E., 2013. 'Identifikasi Pigmen Karotenoid Pada Bakteri Simbion Rumput Laut *Kappahycus alvarezii*, *Jpurnal of Marine Research*, 2(3), 58-67.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton., 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology Seventh Edition.* Newyork: McGraw-Hill.
- Yilmaz, M., Ozic, C. & Gok, I., 2012. *Gel Electrophoresis Principal & Basics.* Croatia: Intech.