

IDENTIFIKASI BAKTERI ASOSIASI KARANG *Porites lutea* YANG TERKENA
PINK LINE SYNDROME SECARA MOLEKULER DI PERAIRAN KONDANG
MERAK, KABUPATEN MALANG

SKRIPSI
PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
JURUSAN PEMANFAATAN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN ILMU
KELAUTAN

OLEH:
MAIKE ARIFIANTI
NIM. 145080601111011



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

IDENTIFIKASI BAKTERI ASOSIASI KARANG *Porites lutea* YANG TERKENA
PINK LINE SYNDROME SECARA MOLEKULER DI PERAIRAN KONDANG
MERAK, KABUPATEN MALANG

SKRIPSI
PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
PEMANFAATAN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Kelautan
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh:
MAIKE ARIFIANI
NIM. 145080601111011



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

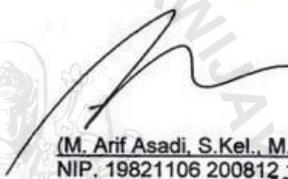
LEMBAR PENGESAHAN
SKRIPSI

IDENTIFIKASI SECARA BAKTERI ASOSIASI KARANG *Porites lutea* YANG
TERKENA *PINK LINE SYNDROME* MOLEKULER DI PERAIRAN KONDANG
MERAK, KABUPATEN MALANG

Oleh:
MAIKE ARIFIANTI
NIM. 145080601111011

Dosen Pembimbing 1

Menyetujui,
Dosen Pembimbing 2



(Feni Iranawati, S.Pi., M.Si., Ph.D)
NIP. 19740812 200312 2 001
Tanggal: 20 JUN 2019

(M. Arif Asadi, S.Kel., M.Sc)
NIP. 19821106 200812 1 002
Tanggal: 20 JUN 2019

Mengetahui,
Ketua Jurusan Pemanfaatan Sumberdaya
Perikanan dan Kelautan



(Dr. Eng. Abu Bakar Sambah, S.Pi., MT)
NIP. 19760717 200502 1 002
Tanggal: 20 JUN 2019



IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL : IDENTIFIKASI BAKTERI ASOSIASI KARANG *Porites lutea* YANG TERKENA *PINK LINE SYNDROME* SECARA MOLEKULER DI PERAIRAN KONDANG MERAK, KABUPATEN MALANG

NAMA MAHASISWA : MAIKE ARIFIANI

NIM : 145080601111011

PROGRAM STUDI : ILMU KELAUTAN

PENGUJI PEMBIMBING

PEMBIMBING 1 : FENI IRANAWATI, S.Pi., M.Si., Ph.D

PEMBIMBING 2 : M. ARIF ASADI, S.Kel., M.Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

PENGUJI 1 : OKTIYAS MUZAKY LUTHFI, S.T., M.Sc

PENGUJI 2 : ANDIK ISDIANTO, S.T., M.T

TANGGAL UJIAN : 24 MEI 2019



PERNYATAAN ORIGINALITAS

Dengan ini, saya yang bernama di bawah ini:

Nama : Maike Arifianti

NIM : 145080601111011

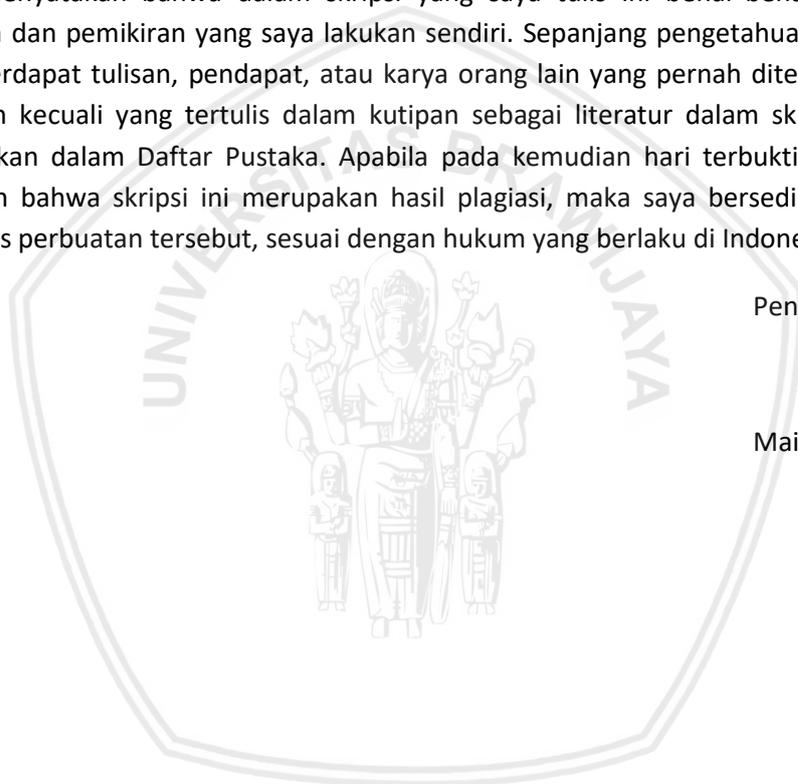
Angkatan : 2014

Program Studi : Ilmu Kelautan

menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil dari penelitian dan pemikiran yang saya lakukan sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak pernah terdapat tulisan, pendapat, atau karya orang lain yang pernah diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam kutipan sebagai literatur dalam skripsi ini dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka. Apabila pada kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Penulis,

Maike Arifianti



UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyadari bahwa dalam penelitian hingga penyusunan Skripsi ini tidakakan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis inginmengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberi berkah dan dan anugerahnya sehingga sekripsi ini dapat selesai dengan baik.
2. Ayah dan Ibu yang telah mensuport secara moril dan materil sehingga skripsi ini dapat berjalan dengan baik sampai akhir.
3. Ibu Feni Iranawati,S.Pi., M.Sc., Ph.D., selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing penulis sejak penyusunan proposal hingga penyusunan Skripsi dan selalu memberikan masukan, kritikan selama bimbingan dan semangat secara moril.
4. Bapak M. Arif Asadi, S.Kel., M.Sc., selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan arahan topik serta dukungan moril dan materil selama penelitian ini berlangsung.
5. Dzikrillah Akbar, Muh. Mifftahul Huda dan Gery Setyo Pambudi yang telah membantu selama proses penelitian.
6. Teman-teman saya Nindya Fatimah Ariani, Gita Putri, Dalendra Kardina, Pipit Runnita, Muh. Wahyu, Noor Aisyiyah, Asa Noerhandayani, dan Lusi Widiawati yang telah memberi semangat sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan.

RINGKASAN

Maiké Arifianti/145080601111011. Identifikasi Bakteri Asosiasi Karang *Porites lutea* yang Terkena *Pink Line Syndrome* secara Molekuler di Perairan Kondang Merak, Kabupaten Malang. (dibimbing oleh: **Feni Iranawati, S.Pi., M.Si., Ph.D.,** dan **M. Arif Asadi, S.Kel., M.Sc**)

Perairan Kondang Merak merupakan kawasan wisata pantai di Malang Selatan yang memiliki keanekaragaman terumbu karang. Karang banyak berasosiasi dengan bakteri ataupun organisme lain yang dapat menyebabkan suatu *syndrome*, salah satunya *Pink Line Syndrome* yang menjadikan karang mempunyai band *pink* yang muncul diantara jaringan koloni karang. Penelitian ini dilakukan untuk identifikasi bakteri yang berasosiasi dengan karang yang terinfeksi *Pink Line syndrome* secara molekuler di Perairan Kondang Merak Malang - Selatan.

Sampel yang diambil adalah dari jenis *Porites lutea* yang terinfeksi *Pink Line Syndrome*. Sampel dihaluskan dan dilakukan pengenceran 10^{-0} yang dijadikan sebagai larutan stok dan dilanjutkan proses penanaman dari pengenceran 10^{-3} hingga 10^{-5} . Bakteri ditanam pada media agar Zobell 2261E (Peptone, Yeast Extract, Agar, air laut steril) dengan metode *spread* yang kemudian di gores dengan metode *zigzag* pada media cawan agar didapat biakan murni. Selanjutnya diamati ukuran, bentuk, margin, dan elevasi untuk mengetahui isolat yang dominan untuk dilakukan peremajaan pada media agar miring. Hasil inkubasi peremajaan isolat murni pada agar miring dikultur ke media Zobell cair yang kemudian diinkubasi 2 x 24 jam. Studi molekuler dilakukan pada 7 isolat dominan mulai dari proses isolasi DNA, PCR, elektroforesis, sequencing serta BLAST untuk mendapatkan informasi genetik dari isolat tersebut. Selanjutnya dilakukan rekonstruksi pohon filogeni untuk mengetahui kekerabatannya.

Hasil dari identifikasi molekuler diketahui bahwa isolat dominan bakteri sebagai berikut; isolat LIFU 99% anggota *Bacillus sp.*, isolat MIRS 83% anggota *Rhodococcus sp.*, isolat MCCE 100% anggota *Staphylococcus arlettae*, isolat SIRL 100% anggota *Lysinibacillus macroides*, isolat SCUE 100% anggota *Bacillus subtilis*, PCRE 100% anggota *Staphylococcus arlettae*, dan isolat SCRE 90% anggota *Pseudomonas stutzeri*. Sedangkan hasil pohon filogeni terdapat 2 percabangan dimana percabangan pertama terdapat semua isolat kecuali isolat MIRS, karena isolat MIRS dalam satu cabang dengan out grup yang telah ditambahkan. Namun hasil rekonstruksi pohon filogeni masih rendah yaitu antara 24-57%.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Laporan Skripsi ini dengan judul “**Identifikasi Bakteri Asosiasi Karang *Porites lutea* yang Terkena Pink Line Syndrome Secara Molekuler di Perairan Kondang Merak, Kabupaten Malang**”. Laporan Skripsi ini disusun sebagai acuan pelaksanaan penelitian skripsi untuk mengetahui tahapan maupun prosedur kerja dalam identifikasi bakteri yang bersimbiosis dengan karang *Porites lutea* yang terkena *Pink Lyne Syndrome* di Perairan Kondang Merak, Kabupaten Malang.

Semoga Laporan Skripsi yang telah disusun ini dapat dipergunakan sebagai acuan, petunjuk maupun pedoman dalam pelaksanaan penelitian skripsi penulis. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan skripsi ini. Apabila terdapat kata – kata yang kurang berkenan, baik dari segi isi maupun penulisan, penulis memohon maaf. Semoga laporan skripsi ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Mei 2019

DAFTAR ISI

Halaman

PERNYATAAN ORIGINALITAS	i
UCAPAN TERIMAKASIH.....	ii
RINGKASAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Perairan Kondang Merak.....	4
2.2 <i>Pink Line Syndrom</i>	4
2.3 Bakteri Asosiasi Karang.....	5
2.3.1 Morfologi Bakteri.....	6
2.4 Identifikasi Molekuler.....	8
3. METODOLOGI	9
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	9
3.2 Diagram Alir Penelitian	10
3.3 Metode Penelitian.....	11
3.3.1 Alat dan Bahan Penelitian.....	12
3.4 Prosedur kerja.....	14
3.4.1 Survei Lokasi Penelitian dan Penentuan Poin Sampling	14
3.4.2 Pengambilan Sampel.....	14
3.4.3 Pengukuran Parameter Lingkungan.....	15
3.4.4 Sterilisasi alat dan bahan	16
3.4.5 Studi Mikrobiologi	16
3.6.6 Studi molekuler	19
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Deskripsi lokasi penelitian	27



4.2	Data Pendukung parameter perairan Kondang Merak	27
4.3	Hasil pengambilan sampel	29
4.4	Hasil mikrobiologi.....	30
4.4.1	Penanaman Isolat dan Pemurnian Bakteri.....	30
4.4.2	Hasil pemurnian dan peremajaan isolat bakteri	34
4.5	Hasil PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	36
4.6	Hasil Squencing dan BLAST.....	37
4.7	Pohon Filogeni Kekerbatan Isolat Bakteri.....	43
5.	PENUTUP	47
5.1	Kesimpulan	47
5.2	Kendala dan Saran.....	47
	DAFTAR PUSTAKA.....	49
	LAMPIRAN.....	54



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Peta lokasi penelitian	9
2. Diagram Alir penelitian	11
3. Sampel <i>Porites lutea</i> yang terinfeksi <i>Pink Line Syndrome</i>	30
4. Pengamatan morfologi ukuran koloni bakteri	31
5. Pengamatan morfologi bentuk koloni bakteri	32
6. Pengamatan morfologi elevasi koloni bakteri	33
7. Pengamatan morfologi margin koloni bakteri	34
8. Pohon filogeni isolat dominan	44



DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

1. Titik pengambilan sampel	10
2. Alat yang diperlukan saat penelitian.....	12
3. Bahan yang diperlukan saat penelitian	13
4. Komposisi media pada setiap cawan	17
5. Perbandingan data parameter lingkungan	28
6. Hasil pemurnian bakteri	35
7. Hasil BLAST	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil pengamatan dan perhitungan isolat bakteri	53
2. Tabel isolat dominan.....	55
3. Hasil pemurnian metode <i>zigzag</i> streak plate.....	56
4. Hasil peremajaan bakteri	57
5. Hasil elektroforegram.....	58
6. Hasil BLAST	59



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perairan Kondang Merak merupakan kawasan wisata pantai di Malang Selatan yang memiliki keanekaragaman terumbu karang sedang dan tutupan karang yang relatif besar (Wahyudi, 2013) dengan kondisi karang buruk hingga sedang (Nugraha, 2016). Karang yang sehat berperan penting dalam produktivitas ekosistem terumbu karang serta bagi masyarakat sekitar secara berkelanjutan.

Penelitian Wahyudi (2013) menunjukkan bahwa di Pantai Kondang Merak Kabupaten Malang ditemukan 7 genus terumbu karang yang meliputi *Acropora*, *Favites*, *Goniastrea*, *Montipora*, *Platygyra*, *Pocillopora*, dan *Porites* yang terdiri dari 22 jenis yaitu *Acropora donei*, *Acropora palifera*, *Acropora sp.*, *Acropora sp.*, *Favites abdita*, *Favites complanata*, *Favites halicora*, *Favites pentagona*, *Favites sp.*, *Favites sp.*, *Favites sp.*, *Goniastrea pectinata*, *Montipora aequituberculata*, *Montipora danae*, *Montipora sp.*, *Montipora sp.*, *Platygyra acuta*, *Platygyra lamellina*, *Platygyra sinensis*, *Pocillopora verrucosa*, *Porites lutea*, dan *Sthylophora pistillata*.

Karang massive dari genus *Porites* (seperti *Porites lutea*, *Porites lobata*) adalah karang penting dalam menyusun terumbu karang di Kepulauan Indonesia. Karang *Porites* mempunyai sebaran yang luas dan tersebar di seluruh Indonesia khususnya di perairan Kondang Merak. Hal ini disebabkan karang *Porites* merupakan karang yang mampu hidup pada berbagai kondisi lingkungan seperti pada daerah yang memiliki ragam variasi dalam sedimentasi tinggi, daerah yang mempunyai fluktuasi salinitas yang tinggi. Salah satu jenis karang yang dominan ditemukan di Perairan Kondang Merak adalah dari genus *Porites*, seperti *P. Lobata* dan *P. Lutea* (Lutfi et al., 2016).

Karang merupakan organisme yang rentan terhadap perubahan lingkungan baik yang disebabkan oleh faktor alamiah maupun antropogenik dan biotik maupun abiotik (Ravindran, 2006). Salah satu penyakit yang dapat menyerang *P. lutea* adalah *Pink Line Syndrome* (PLS). *P. lutea* yang terkena PLS memiliki *band* berwarna *pink* yang muncul antara jaringan koloni karang. Karang *Sclerectinia* menjadi rentan terhadap penyakit sebagai respon fisiologis terhadap tekanan lingkungan (*enviromental stress*) (Abdel-Salam et al., 2014).

Bakteri yang bersimbion dengan karang telah banyak dikarakterisasi dan diketahui beberapa berpotensi sebagai sumber kimia bahan hayati laut. Asosiasi bakteri dapat menyebabkan penyakit karang yang merusak jaringan pada bagian karang, salah satunya menyerang jaringan hidup pada karang (*tissue loss*). Analisa secara mikrobiologi dan molekuler menjadi suatu tahapan metode dalam menganalisa jenis bakteri simbion pada karang. Salah satu kelebihan dari identifikasi secara molekuler adalah dapat dilakukan dengan cepat dan akurat karena ekspresinya tidak terpengaruh oleh lingkungan tumbuh dan umur bakteri (Susilo, 2007).

Informasi tentang bakteri asosiasi dengan karang yang terinfeksi penyakit PLS perlu diketahui sebagai salah satu acuan dalam pengendalian penyakit karang. Selain itu, bakteri yang berasosiasi dengan karang terinfeksi penyakit akan mengalami stress dan mengeluarkan metabolit sekunder untuk pertahanan diri terhadap bakteri patogen. Metabolit sekunder tersebut kemungkinan dapat digunakan sebagai antimikroba dan anti kanker (Usman, 2015). Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang bakteri yang berasosiasi dengan karang yang terinfeksi penyakit PLS di perairan Kondang Merak yang mana menjadi lokasi pengamatan serta pengambilan sampel pada karang yang terinfeksi PLS. Mekanisme pembentukan PLS di jaringan koloni karang merupakan sebuah peringatan dini untuk melindungi ekosistem terumbu karang. Indikator

terinfeksi PLS pada karang akibat meningkatnya CO₂ di atmosfer yang dapat menyebabkan kelainan fisiologis pada karang (Ravindran, 2006).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang timbul dari latar belakang di atas adalah:

1. Bakteri apa saja yang berasosiasi dengan karang *Porites lutea* yang terkena *Pink Line Syndrome*?
2. Apakah bakteri yang ditemukan memiliki hubungan kekerabatan yang dekat?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun Tujuan dari penelitian yang dilakukan dalam laporan skripsi berikut ialah:

1. Untuk mengetahui bakteri apa saja yang berasosiasi dengan karang *P. lutea* yang terkena PLS secara molekuler.
2. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara bakteri yang ditemukan.

1.4 Kegunaan

Adapun kegunaan yang akan didapatkan dari penelitian ini yaitu mahasiswa dapat mengetahui prosedur penelitian untuk mengidentifikasi bakteri yang berasosiasi dengan karang *P. lutea* yang terkena PLS secara molekuler. Selanjutnya mahasiswa dapat menambah wawasan mengenai bakteri apa saja yang berasosiasi dengan karang *P. lutea* yang terkena PLS. Selain itu penelitian ini diharapkan mampu menambah daftar penelitian dibidang molekuler di Indonesia.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perairan Kondang Merak

Kondang Merak adalah salah satu pantai di Malang selatan yang memiliki daya tarik besar bagi wisatawan dan memiliki keanekaragaman terumbu karang yang baik. Kondisi terkini terumbu karang di lokasi ini berada di bawah ancaman yang banyak ditemukan reruntuhan di dekat zona pemanfaatan yang mungkin disebabkan oleh kegiatan pariwisata. Sebenarnya kondisi terumbu karang di Kondang Merak menurun dengan cepat karena banyaknya kegiatan perikanan di daerah itu, kenaikan suhu air laut dan beban air tawar dari daratan atas (Luthfi et al., 2016).

Kondang Merak merupakan pantai wisata di Malang yang ramai dikunjungi oleh wisatawan untuk melakukan berbagai aktivitas rekreasi. Pantai ini memiliki *reef flat*, *reef crest*, dan *fore reef*. Keberadaan zona ini menjadi salah satu daya tarik wisata bahari seperti snorkling karena pemandangan bawah air yang indah. Selain aktivitas tersebut, banyak aktivitas lain yang dilakukan oleh wisatawan seperti memancing, bermain air, maupun berfoto. Akses jalan ke pantai ini juga semakin mudah dengan adanya pembangunan Jalur Lintas Selatan (JLS) yang sedang berlangsung. Namun, seiring dengan makin mudahnya akses menuju pantai ini, jumlah wisatawan tentu akan meningkat. Peningkatan jumlah wisatawan yang berlebih tentu akan berdampak pada kehidupan organisme seperti karang (Nugraha et al., 2016).

2.2 *Pink Line Syndrom*

Infeksi penyakit umumnya terjadi ketika karang mengalami stres akibat tekanan dari lingkungan, seperti pencemaran, suhu tinggi, sedimentasi, nutrient yang tinggi terutama nitrogen dan senyawa karbon, predator, kompetisi dengan

alga yang pertumbuhannya sangat cepat, dan kondisi fisiologis yang lemah setelah terjadi pemutihan (Rahmi, 2014). Munculnya penyakit karang dicirikan dengan adanya perubahan warna, kerusakan dari skeleton biota karang, sampai dengan kehilangan jaringannya. Munculnya penyakit tersebut merupakan interaksi antara host atau inang dalam hal ini biota karang, agen/penyebab penyakit dalam hal ini patogen, dan lingkungan (Hazrul et al., 2016).

Salah satu infeksi pada karang yaitu PLS dimana mekanisme pembentukan PLS di jaringan koloni karang merupakan sebuah peringatan dini untuk melindungi ekosistem terumbu karang. Indikator terinfeksi PLS pada karang akibat meningkatnya CO₂ di atmosfer yang dapat menyebabkan kelainan fisiologis pada karang. Lebar band pada jaringan sebesar 1 mm dimana *band pink* mengelilingi sebagian koloni yang mati (Ravindran, 2006). Menurut Credit (2013) menjelaskan bahwa penyakit pada karang tidak disebabkan oleh patogen tertentu. Tetapi penyakit dapat menyerang karang jika pertahanan diri karang mulai melemah.

2.3 Bakteri Asosiasi Karang

Menurut (Boleng, 2015), bakteri merupakan organisme yang memiliki dinding sel. Oleh karena itu, jika dikaji dari struktur selnya (kandungan dinding sel), maka bakteri dikelompokkan ke dalam tumbuhan. Jika dikaji dari kemampuan beberapa sel bakteri yang bergerak dan berpindah tempat, maka bakteri dikelompokkan ke dalam hewan. Namun dalam klasifikasi makhluk hidup dengan sistem lima dunia menurut Whittaker pada tahun 1969, bakteri dikelompokkan ke dalam dunia Monera. Sel bakteri meliputi struktur halus (*ultrastructure*) dimana sel tersebut dapat ditumbuhkan pada media seperti habitat alami bakteri tersebut. Proses penanaman harus memperhatikan nutrisi

dalam media pertumbuhannya. Jika semua nutrisi terpenuhi maka sel yang ditumbuhkan di laboratorium akan mengalami pertumbuhan.

Umumnya bakteri mempunyai sel tunggal (*uniseluler*), tidak mempunyai zat hijau daun/klorofil dan perkembangbiakannya dengan cara pembelahan sel secara transversal atau biner. Hidupnya bebas secara cosmopolitan dimana-mana khususnya di udara, di tanah, di dalam air, pada bahan makanan, pada tubuh manusia, tanaman atau hewan. Adapula yang hidup bersimbiosis dengan jasad hidup lain baik tanaman atau hewan seperti karang. Pada umumnya bakteri hidup dengan sifat saprofitik pada sisa buangan hewan atau tanaman yang sudah mati. Akan tetapi banyak juga yang parasitik terhadap hewan, manusia, dan tanaman yang menyebabkan banyak jenis penyakit (Suriawira, 1995).

2.3.1 Morfologi Bakteri

Menurut Hadietomo dalam Dwidjoseputro (1981), menjelaskan bahwa bentuk morfologi bakteri akan terpengaruh oleh keadaan lingkungan, media dan usia. Morfologi bakteri dibedakan dari bentuk, ukuran, elevasi dan margin pada suatu medium. Penjelasan terkait morfologi bentuk bakteri sebagai berikut.

1. Ukuran

Ukuran bakteri bervariasi baik penampang maupun panjangnya. Ukuran pada bakteri akan mengacu pada ukuran bakteri pada tiap cawan petri yang ditanam pada suatu medium, ukuran bakteri terbagi kedalam 3 bentuk morfologi yaitu poin (*pinpoint*), kecil (*small*), sedang (*moserate*), dan besar (*large*).

2. Form (bentuk)

Bentuk tubuh bakteri mengacu kepada bentuk dari suatu koloni bakteri pada suatu medium. Pada umumnya bentuk bakteri akan

terpengaruh oleh usia dari bakteri pada suatu medium, lebih muda usianya maka ukurannya relatif lebih besar daripada yang sudah tua. Bentuk tubuh dari bakteri dibagi menjadi 4 yaitu melingkar (*circular*), tidak menentu (*irregular*), benang (*filamentous*), dan berakar (*rhizoid*). *Form* tersebut adalah bentuk-bentuk dari koloni bakteri yang mungkin akan sering kita jumpai.

3. Elevasi

Elevasi dari suatu bakteri akan mempengaruhi jenis koloni bakteri yang terdapat pada suatu medium. Mendeskripsikan elevasi pada bakteri dapat dilakukan dengan cara melihatnya dari tampak samping. Beberapa jenis elevasi adalah rata (*flat*), timbul (*raised*), timbul dan memiliki tonjolan kecil (*unbonate*), dan cembung (*convex*).

4. Margin

Tepian suatu koloni bakteri merupakan salah satu karakteristik yang penting dalam mengidentifikasi bakteri. Jenis – jenis margin dari suatu bakteri antara lain penuh (*entire*), bergelombang (*undulate*), berlekuk (*lobate*), keriting (*curled*), dan seperti kawat (*filiform*).

Pada penelitian Ravindran and Chandralata Raghukumar (2006), mendapatkan bahwa *Pink Line Syndrome* tampaknya disebabkan oleh cyanobacterium *P. valderianum*, pada pengamatan bahwa PLS selalu ada di koloni *P. lutea* yang terkena dampak PLS dan inokulasi dengan Cyanobacterium. Akan tetapi menurut Credit (2013), penemuan bakteri pada karang berbeda-beda karena karang mempunyai kemampuan dalam mempengaruhi komposisi mikroba yang dapat menempel dan bersimbion dengannya. Karang sendiri dapat memicu respon pertahanan untuk *exclude* anggota komunitas yang tidak diinginkan dan memilih hidup bersimbion dengan mikroba tertentu.

2.4 Identifikasi Molekuler

Identifikasi bakteri adalah tugas lazim yang dilakukan di laboratorium. Proses yang dilakukan harus cepat, tepat dan steril sehingga dapat diidentifikasi nama bakteri yang berasosiasi dengan karang *P. lutea*. Bakteri yang akan diisolasi dapat berupa biakan murni atau campuran (Boleng, 2015).

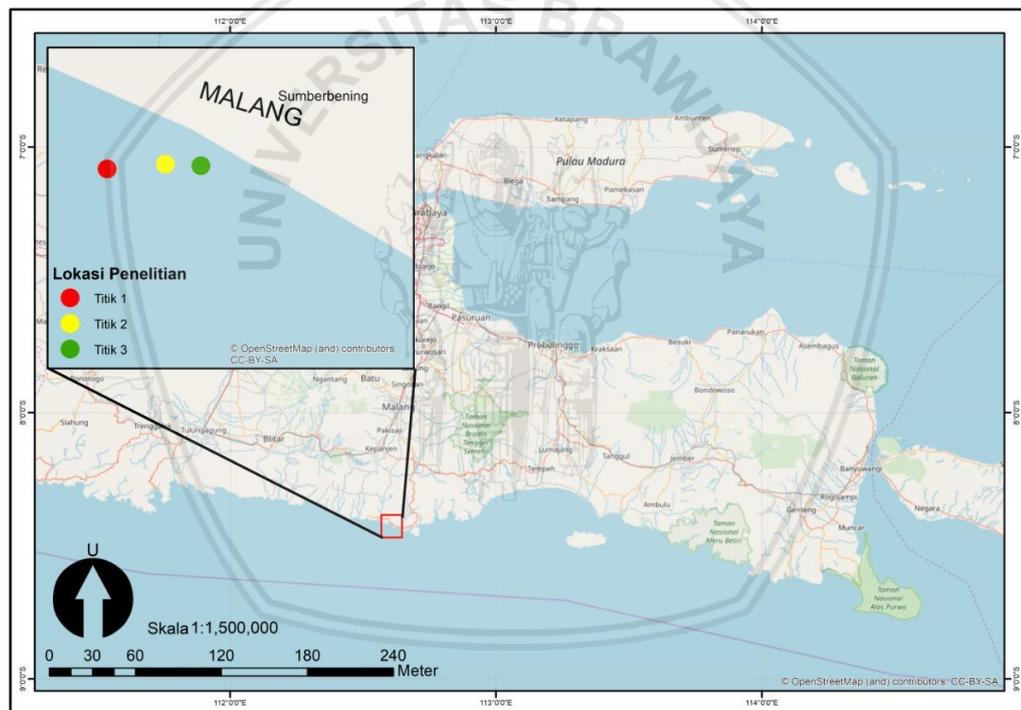
Identifikasi secara molekuler ialah cara terbaik yang dapat dilakukan agar didapat pula informasi genetik dari jenis bakteri yang sedang dikaji. Proses identifikasi secara molekuler dimulai dari proses ekstraksi dan isolasi DNA (*Double Nucleic Acid*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Elektroforesis, yang kemudian dilanjutkan dengan *Sequencing* untuk mendapatkan data berupa elektroforegram dari basa nitrogen dari sampel bakteri. Selanjutnya data tersebut diolah dalam software MEGA dan dilakukan pencarian kesamaan pasangan basa dengan isolat referensi yang terdapat di Gen Bank yaitu BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Sabdono and Radjasa, 2006a).

Identifikasi spesies secara akurat menggunakan metode tradisional bisa memakan waktu yang lama disebabkan kurangnya pengetahuan mengenai bakteri yang dibutuhkan untuk identifikasi (Colpaert *et al.*, 2005). Identifikasi spesies berbasis sekuens DNA merupakan metode yang dianggap cepat, dapat dipertanggungjawabkan, dan konsisten, sehingga penting dalam penelitian biologi konservasi dan keanekaragaman (Waugh, 2007). Identifikasi dengan sekuens DNA dilakukan menggunakan penanda molekuler. Salah satu penanda molekuler yang saat ini digunakan dalam mengungkapkan taksonomi yaitu kode batang DNA (DNA barcoding) yang merupakan urutan sekuen pendek DNA yang dapat menunjukkan variasi genetik dalam suatu spesies (Chippindale *et al.*, 1999).

3. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei - Juni 2018. Pengambilan sampel dilakukan di Perairan Kondang Merak, Malang Selatan pada tanggal 29 Mei 2018. Sedangkan, analisis dan identifikasi dilaksanakan Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler, Fakultas SAINTEK UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang dan PT. Genetica Science, Jakarta. Adapun peta lokasi pengambilan sampel yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peta lokasi penelitian

Sampel karang di ambil di perairan Kondang Merak sebanyak 3 stasiun. Titik koordinat dari setiap stasiun terdapat pada Tabel 1. Setiap stasiun di ambil 3 potongan koloni karang yang nantinya akan dijadikan sampel stok jika terjadi kerusakan pada salah satu sampel.

Tabel 1. Titik Pengambilan Sampel

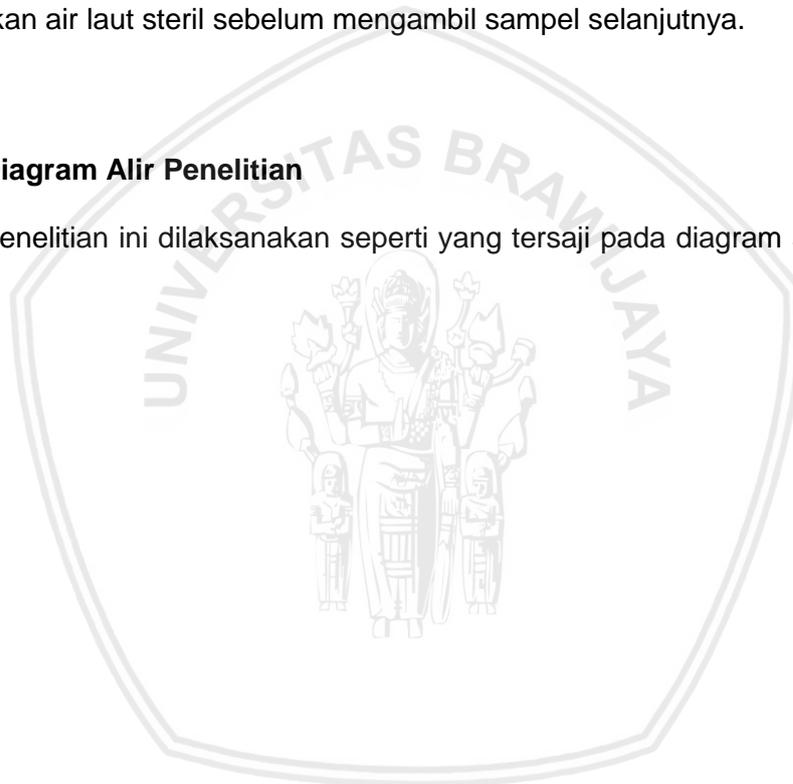
Stasiun	Longitude	Latitude
1.	112°31.138'S	8°23.817'S
2.	112°31.173'S	8°23.816'S
3.	112°31.158'S	8°23.815'S

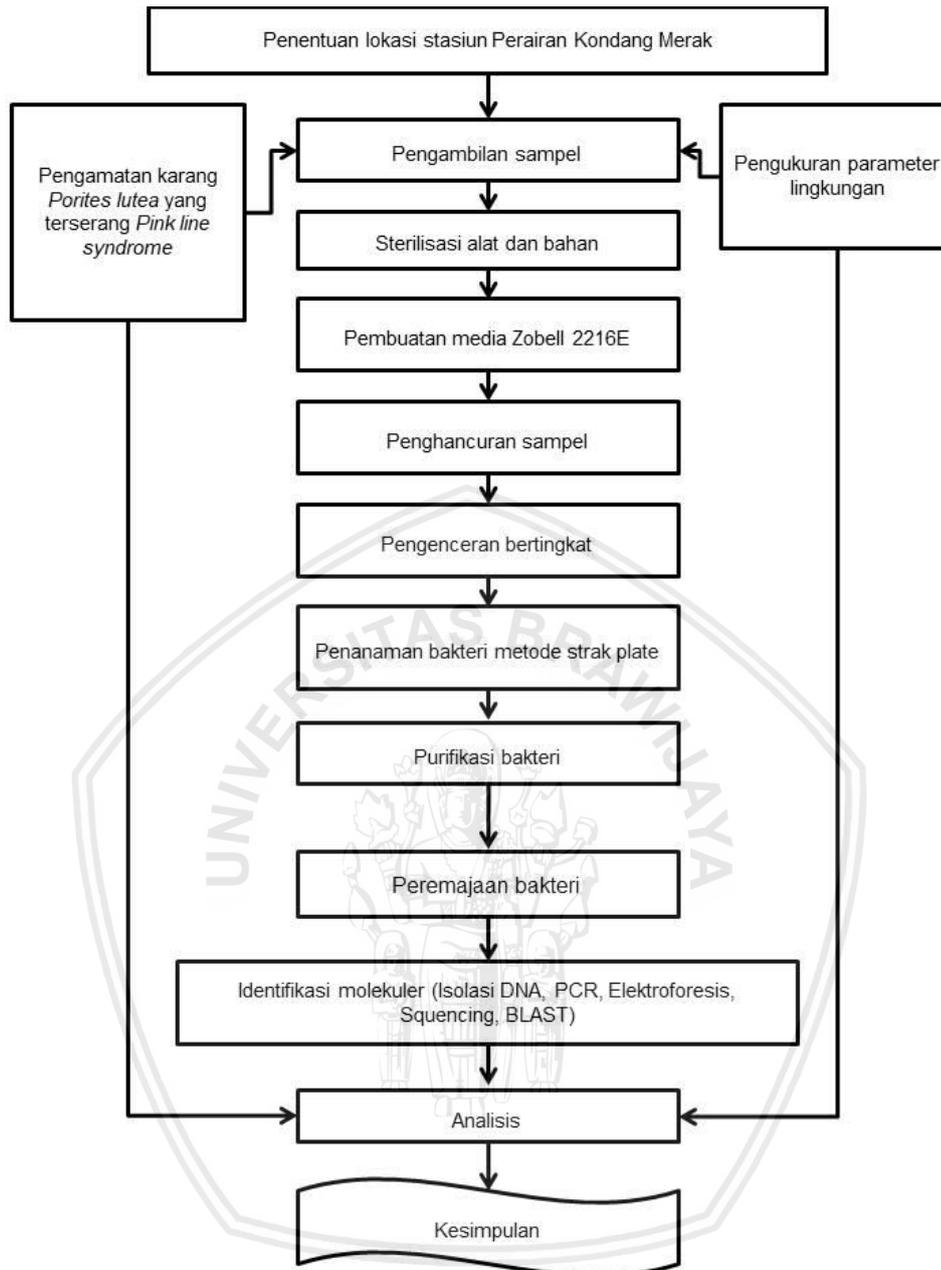
Setiap stasiun di ambil 3 potongan koloni karang yang nantinya akan dijadikan sampel stok jika terjadi kerusakan pada salah satu sampel. Pengambilan sampel juga dilakukan secara steril, yaitu dengan membilas pisau dan tatah menggunakan alkohol 70% dari stasiun 1 ke stasiun lain dan di semprotkan air laut steril sebelum mengambil sampel selanjutnya.

3.2 Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan seperti yang tersaji pada diagram alir Gambar

2.





Gambar 2. Diagram alir penelitian

3.3 Metode Penelitian

Metode yang dilakukan pada penelitian ini adalah deskriptif. Metode deskriptif merupakan metode yang dilakukan dengan tujuan utama untuk membuat gambaran atau deskriptif tentang suatu keadaan. Penelitian bersifat deskriptif dengan tujuan utama memberi gambaran atau deskripsi tentang suatu

keadaan secara objektif. Penelitian ini bertujuan untuk menggambarkan hasil identifikasi bakteri pada karang *P. Lutea* secara molekuler di perairan Kondang Merak. Metode pengambilan sampel secara *purposive sampling* purposive sampling merupakan salah satu teknik yang sering digunakan dalam penyelidikan kualitatif. Karakteristik individu digunakan sebagai dasar seleksi (Notoatmodjo, 2002).

3.3.1 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat pada studi mikrobiologi serta alat penelitian di lapangan (Tabel 2 dan Tabel 3).

Tabel 2. Alat yang Diperlukan Saat Penelitian

No.	Nama Alat	Kegunaan
1	Alat Selam Dasar	Perlengkapan skin diving
2	<i>Autoclave</i>	Sterilisasi basah
3	Buku identifikasi karang	Mengidentifikasi karang
4	Bunsen	Pengkondisian aseptis
5	Cawan petri	Tempat melakukan penanaman
6	<i>Cool box</i>	Penyimpan sampel sementara
7	<i>Cool box</i>	Menyimpan sampel
8	<i>Crushable</i> tang	Alat bantu mengambil benda yang panas
9	GPS (<i>Global Positioning System</i>)	Survey positioning
10	Inkubator	Untuk menginkubasi media pada suhu tertentu
11	Jarum ose	Menginokulasi mikroba dari media padat ke padat
12	Kamera <i>under water</i>	Dokumentasi
13	Kulkas	Menyimpan sampel dan media isolasi
14	Laminar <i>Air Flow</i>	Tempat isolasi bakteri
15	<i>Magnetic stirer</i>	Menghomogenkan bahan media
16	Meteran jahit	Mengukur diameter koloni terumbu karang
17	<i>Microwave</i>	Alat pemanas
18	<i>Mikropipet</i>	Alat pemindah cairan bervolume kecil
19	Mortal alu	Menghaluskan sampel
20	pH meter	Mengukur pH air
21	Plastik <i>zip lock</i>	Wadah sampel
22	Preparat	Alat penyebar sampel
23	Rak tabung reaksi	Tempat tabung reaksi
24	Salinometer	Mengukur salinitas

No.	Nama Alat	Kegunaan
25	<i>Spreader</i>	Meratakan sampel
26	<i>Sentrifuse</i>	Alat untuk sentrifugasi
27	Tabung reaksi	Tempat pengenceran
28	Tatah dan Palu	Pengambilan sampel karang
29	Termometer	Mengukur suhu air
30	Timbangan	Menimbang bahan
31	<i>Vortex mixer</i>	Menghomogenkan sampel

Adapun bahan yang diperlukan pada saat penelitian terdapat pada Tabel

Tabel 3. Bahan yang diperlukan saat penelitian

No.	Nama Bahan	Volume	Kegunaan
1	Agarose	12 Gram	Elektroforesis
2	Air	5 Liter	Membersihkan alat-alat ketika sudah selesai
3	Air laut steril	5 Liter	Pengenceran dan pembuatan media
4	Alkohol 70%	1,5 Liter	Sterilisasi alat dan tempat kerja
5	Aquabides	500 mL	Ekstraksi DNA
6	Aquades	3 Liter	Pembuatan media dan larutan
7	Buffer TBE 1x	2800	Elektroforesis
8	DNA <i>Marker</i>	5 mL	Penanda pita DNA
9	Ethidium bromide	5 mL	Elektroforesis (pewarna DNA)
10	Latek	2 pack	Penutup tangan
11	Loading buffer	5 mL	Elektroforesis (pemberat DNA)
12	Mega Mix Royal	10 mL	Amplifikasi PCR
13	Parafilm	3 pack	Penutup cawan petri saat isolasi
14	PCR mix	70 µl	Proses PCR
15	Pepton	2 Gr	Bahan media isolasi bakteri
16	Plastik <i>wrap</i>	1 pack	Pembungkus cawan petri saat pembuatan media
17	Primer 1492 R	70 µl	Amplifikasi PCR 16S
18	Primer 27 F	70 µl	Amplifikasi PCR 16S
19	Reagen kit	-	Ekstraksi DNA
20	Spritus	1,5 liter	Pengkondisian aseptis
21	Tip Biru	50	Isolasi bakteri dan DNA bakteri
22	Tip kuning	25	Isolasi bakteri
23	Tip putih	50	Isolasi DNA bakteri
24	Tissue	2 Pack	Membersihkan kelebihan warna
25	Tube 1,5 ml	7 buah	Tempat sampel DNA
26	Tube 2ml	7 buah	Tempat sampel DNA
27	Tube PCR 0,2 ml	7	Isolasi DNA bakteri
28	Water PCR	42 µl	Proses PCR

No.	Nama Bahan	Volume	Kegunaan
29	grade Yeast ekstrak	1 Gr	Bahan media isolasi bakteri

3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Survei Lokasi Penelitian dan Penentuan Poin Sampling

Survei Penelitian dilakukan di Perairan Kondang Merak, Kecamatan Bantur, Malang Selatan pada kedalaman ± 5 meter dengan menggunakan alat bantu masker dan snorkel. Survey lokasi dilakukan untuk mengetahui penyakit karang *pink line syndrome* yang terdapat di Perairan Sendang Biru dengan melakukan dokumentasi menggunakan *underwater camera* dan melakukan penandaan dengan menggunakan GPS.

3.4.2 Pengambilan Sampel

Karang didokumentasikan dan dicatat hingga tingkat genus kemudian diidentifikasi dengan menggunakan *coral finder* dari Russel Key. Menurut Milne Edwards dan Haime (1851) karang Porites diklasifikasikan sebagai berikut,

Kingdom : Animalia

Phylum : Cnidaria

Class : Anthozoa

Order : Scleractinia

Family : Poritidae

Genus : Porites

Species : Porites lutea

Identifikasi penyakit karang dilakukan dengan mendokumentasikan karang yang terkena penyakit, kemudian diidentifikasi menggunakan *Underwater Cards for Assessing Coral Healthon Indo-Pacific Reefs*. Menurut Moelyaningrum

(2016), *pigmentation response* merupakan lesi yang terjadi pada perbatasan jaringan karang berwarna cerah. Warna *pink* biasanya ditemukan pada karang *Porites sp.* dan warna *purple* ditemukan pada *Acropora sp.* Lesi tersebut dapat membengkak atau bertambah tebal yang menyebabkan pigmentasi membentuk garis, tonjolan, bintik-bintik, bercak atau tidak beraturan tergantung dari penyebab lesi. Penyebab lesi antara lain cacing, kompetisi, alga, gigitan ikan dan kerusakan pada karang itu sendiri. Namun PLS memiliki ciri lebar band pada jaringan sebesar 1mm dimana band pink mengelilingi sebagian koloni yang mati. (Ravindran, 2006).

Pengambilan sampel dilakukan pada saat surut dengan cara *snorkeling*. *Fragmen* karang diambil dengan menggunakan tatah dan palu dengan metode *scraping* pada karang yang terjangkit penyakit *Pink line syndrome*. *Fragmen* langsung dimasukkan ke dalam plastik *zip lock* (plastik polietilen) secara hati-hati untuk menghindari kontak dengan udara. Selanjutnya seluruh sampel dimasukkan ke dalam *cool box* yang berisi es batu dan langsung dibawa ke Laboratorium (Asadi *et al.*, 2017).

3.4.3 Pengukuran Parameter Lingkungan

Parameter lingkungan yang diukur antara lain suhu, salinitas, dan pH dilakukan secara insitu. Menurut Saputri *et al.*, (2016) menyebutkan bahwa ekosistem terumbu karang umumnya terdapat di perairan tropis yang sangat rentan dengan perubahan lingkungan hidupnya terutama suhu, salinitas dan eutrofikasi. Adanya hubungan antara karang dengan bakteri merupakan salah satu faktor yang harus diperhatikan, keberadaan bakteri di dalam koloni karang diperlukan sebagai penyedia nutrisi untuk proses fotosintesis zooxanthellae pada seluruh bagian dari rangka karang. Berdasarkan penelitian Subagiyo *et al.*, (2015) menyatakan bahwa suhu, salinitas dan pH berpengaruh terhadap

pertumbuhan bakteri terutama berpengaruh pada produksi asam laktat organik bakteri. Hasil pengukuran suhu, salinitas dan pH dibandingkan dengan penelitian yang terdahulu apakah terjadi kenaikan atau penurunan nilai.

3.4.4 Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi adalah proses membebaskan suatu benda dari semua mikroorganisme, baik bentuk vegetatif maupun bentuk spora. Sterilisasi dengan kata lain dapat diartikan mematikan semua bentuk kehidupan (Boleng, 2015). Alat dan bahan disterilkan menggunakan *Autoclave*. Alat dan bahan dibungkus menggunakan plastik dan aluminium foil. Isi *Autoclave* dengan air sampai pada batas pemanas. Masukkan alat dan bahan ke dalam *Autoclave* dan tutup *Autoclave* kemudian nyalakan kompor selama 20 menit dalam tekanan 1,5 atm pada suhu 121°C. Selanjutnya dimatikan kompor dan ditunggu sampai tekanan menjadi 0 atm. Klep dibuka dari *Autoclave* dan keluarkan alat dan bahan kemudian dikeringkan menggunakan oven. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dalam tekanan 1,5 atm.

Selain alat-alat yang akan digunakan, media yang akan digunakan untuk penanaman harus disterilisasi agar menghindari kontaminasi bakteri yang tumbuh pada media. Media *Marine Zobell Agar* di sterilisasi setelah air laut steril dimana air laut di masukkan ke dalam Erlenmeyer $\frac{3}{4}$ dari volume Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil. Setelah komposisi media tercampur di sterilisasi menggunakan *autoclave*.

3.4.5 Studi Mikrobiologi

Pendekatan mikrobiologi ini dilakukan untuk mendapatkan koloni murni dimana tahapannya meliputi ekstraksi sampel, pengenceran bertingkat, penanaman pada media agar, pemurnian, dan peremajaan koloni bakteri.

3.4.5.1 Pembuatan media dan pengolahan sampel

Sebelum mengolah sampel yang akan dikultur, perlu disiapkan media menggunakan media *Marine Agar Zobell 2216*. Media ini dibuat dan dituang ke dalam cawan petri yang sudah disterilisasi. Komposisi media Zobell 2216 menurut (Usman, 2015), terdiri dari 2,5 gram pepton, 0,5 gram *yeast extract*, 15 gram bubuk agar, dan selanjutnya dilarutkan dalam 1 liter air laut steril. Semua komposisi tersebut dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* yang kemudian dipanaskan menggunakan *microwave* dan disterilisasi kembali sebelum dituangkan ke dalam cawan petri sebagai media kultur bakteri dari sampel. Setiap satu cawan petri berisi 20 ml media agar Zobell.

Media yang digunakan dalam penelitian ini terdapat 2 jenis, yaitu *Marine Agar Zobell* dan *Marine Broth Zobell*. Media yang digunakan harus dalam keadaan steril dengan melakukan sterilisasi menggunakan *Autoclave*. Berikut merupakan komposisi media dalam setiap 1 cawan petri dan 1 tabung reaksi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi media pada setiap cawan

Media	Komposisi	Satuan	Berat
Marine Agar (Cp)	Air Laut Steril	ml	20
	Yeast Extra	gr	0,01
	Pepton	gr	0,05
	Agarose	gr	0,3
Marine Agar (Tr)	Air Laut Steril	ml	10
	Yeast Extra	gr	0,005
	Pepton	gr	0,025
	Agarose	gr	0,15
Marine Broth (Tr)	Air Laut Steril	ml	10
	Yeast Extra	gr	0,005
	Pepton	gr	0,025

Setiap komposisi ditimbang dan dimasukkan ke dalam Tabung reaksi kemudian homogenkan menggunakan magnetik *stirrer* di atas *hotplate* agar komposisi agar dapat menyatu dengan komposisi lain, setelah itu dilakukan proses sterilisasi media menggunakan *Autoclave*. Media yang sudah jadi dituang

pada masing-masing cawan dan tabung reaksi dengan memiringkan 30° yang telah disterilisasi, perlakuan dilakukan pada *Laminar Air Flow*. Media disimpan dengan melapisi sisi luar cawan dengan plastik wrap dan untuk tabung reaksi dengan kapas dan plastik *wrap* di lemari pendingin.

3.4.5.2 Isolasi dan Purifikasi Bakteri

Pengenceran dilakukan untuk menurunkan jumlah mikroba sehingga semakin banyak pengenceran dilakukan semakin sedikit jumlah mikroba yang ada. Larutan pengenceran yang digunakan hanya yang bersifat osmotik yaitu sama dengan larutan asalnya. Hal ini dilakukan agar tidak merusak sel dan tidak terjadi perbanyakan sel selama pengenceran (Panjaitan, 2014). Pada penelitian ini larutan pengenceran menggunakan air laut yang telah di sterilkan menggunakan *Autoclave*. Proses pengenceran dilakukan secara steril dengan menggunakan mikropipet dengan mengganti setiap tube sekali pakai agar tidak terjadi kontaminasi.

Penanaman bakteri yang berasal dari karang yang terkena *Pink Line Syndrome* menggunakan metode penyebaran (*spread plate*). Menurut Brock dan Madigan dalam Sabdono dan Radjasa, (2006), fragmen karang yang telah diambil dimasukkan ke dalam 9 mL air laut steril yang sebelumnya telah dihancurkan menggunakan mortal dan alu. Dengan demikian diperoleh pengenceran 10^0 . Dari pengenceran 10^0 tersebut diambil 0,5 mL sampel menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 4,5 mL air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-1} . Demikian selanjutnya sehingga diperoleh pengenceran sampel hingga 10^{-5} . Sebanyak 50 μ L (0,05 mL) dari tiap seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} masing-masing disebar ke dalam cawan petri berisi media agar Zobell 2216E dengan menggunakan

spreader. Kemudian cawan petri di tutup menggunakan *parafilm* serta dibungkus menggunakan plastik *wrap* untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 7 hari.

Selama masa inkubasi 7 hari, koloni bakteri diamati bentuk koloni, warna dan tekstur koloninya, Setiap koloni yang mempunyai bentuk dan warna berbeda dipisahkan. Kemudian metode goresan dilakuakn untuk pemisahan dan pemurnian setiap isolat bakteri (Sabdono and Radjasa, 2006b).

Setiap Koloni yang berbeda digoreskan pada permukaan media Zobell 2216E steril pada masing-masing cawan petri yang telah disiapkan. Setelah itu cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu kamar (30°C) selama 2x24 jam dan diamati pertumbuhannya. Apabila tumbuh koloni-koloni baru, maka dilakukan penggoresan ulang pada media agar Zobell 2216E hingga didapatkan koloni tunggal. Isolat bakteri kemudian di tumbuhkan dalam tabung reaksi yang berisi media agar miring Zobell 2216E dan diberi parafin cair steril supaya tidak kehilangan kemampuannya. Pemindahan dan pemeliharaan kultur dilakukan dengan cara menstransfer kultur murni tersebut ke agar miring yang baru. Pemindahan ini dilakukan jika agar miring sudah terlihat kurang baik untuk pertumbuhan bakteri dan kultur murni bakteri yang habis atau agar miring mu lai tampak kering.

3.6.6 Studi molekuler

Tahapan analisis molekuler meliputi ekstrasi DNA, Amplifikasi 16S rRNA, Purifikasi hasil PCR 16S rRNA, Sekuensing, BLAST homologi, serta analisis filogeni.

3.6.6.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan prosedur dari Kit Isolasi DNA (*Wizard Genomic DNA Purification Kit from Promega*) dengan langkah berikut; Diambil 0,3 ml sampel isolat, masukkan dalam tube 2 ml yang berisi 1,5 ml *Buffer Cell Lysis Solution* dan di *Mix* (sampai tercampur). Inkubasi pada suhu ruang Selama 10 menit kemudian *Centrifuge* 1000 x g selama 1 menit. Supernatan dibuang dengan tetap memperhatikan pelet agar tidak ikut terbang, pelet ditambahkan 1 ml *Nuclei Lysis* dan di vortex. Tambahkan 0,3 ml *Protein Precipitation solution*, kemudian di vortex selama 20 detik, *centrifuge* 1000 x g selama 1 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan tube 1,5 ml baru yang berisi 1 ml isopropanol kemudian di vortex dan di *centrifuge* 1000 x g selama 1 menit. Supernatant di buang (pelet tidak boleh terbang), ditambahkan 1 ml ethanol 70% *Centrifuge* 1000 x g selama 1 menit, Supernatant di buang pelet dikeringkan dengan vakum untuk memastikan ethanol benar-benar hilang. Hasil pelet dilarutkan dengan menambahkan 75 µl *DNA Rehydration Solution*, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam, selanjutnya disimpan pada suhu -20° C hingga digunakan.

3.6.6.2 Amplifikasi dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Amplifikasi genotyping polimorfisme dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* atau PCR dengan menggunakan mesin *thermocycler*. Komposisi PCR dengan volume total 20 µl/*tube* terdiri atas 6 µl ddH₂O, 10 µl *PCR kit GoTaq® Green Master Mix* (10 x *buffer taq polymerase*, *dNTP*, *MgCl₂*, *primer*, *Taq DNA polymerase*, ddH₂O), *primer forward* 1 µl, *primer reverse* 1 µl dengan primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan primer spesifik eubacteria 1492R (5'-TGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Roff *et al.*, 2011). dan 2 µl DNA genomik

sampel. Penentuan suhu amplifikasi mengacu pada Correa (2012), secara berurutan proses amplifikasi dikondisikan pada suhu pre-denaturasi 95 °C selama 5 menit 1 kali siklus dan denaturasi dengan 30 kali siklus pada suhu 95 °C 30 detik, 52 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik, dilanjutkan dengan 1 siklus ekstensi pada suhu 72 °C selama 10 menit dan suhu 4 °C selama 5 menit.

3.6.6.3 Konfirmasi Hasil Amplifikasi

Hasil PCR semua sampel DNA yang telah diamplifikasi dikonfirmasi dengan menggunakan elektroforesis horizontal gel agarosa 1,5%. Gel agarosa 1,5% dilakukan dengan cara berikut ini. Bubuk agarosa ditimbang sebanyak 0,6 gram kemudian dilarutkan di dalam 40 ml TBE *buffer* dan dipanaskan hingga terbentuk larutan yang transparan (bening). Larutan agarosa didiamkan hingga hangat kemudian dituangkan ke dalam cetakan elektroforesis yang telah ditambah dengan 0,5 µl etidium bromida. Sisir dipasang pada ujung bak elektroforesis dan didiamkan hingga larutan agarosa mengeras (gel). Sisir diambil pada gel agarosa yang telah terbentuk kemudian dipindahkan pada bak elektroforesis ditambah dengan TBE *buffer* hingga seluruh permukaan gel tertutup larutan *buffer*. Sebanyak 2 µl sampel DNA dicampur dengan 1 µl *loading dye* dicampur kemudian dimasukkan ke dalam sumuran secara perlahan. Selanjutnya, dilakukan proses elektroforesis (*running*) dengan tegangan 65 Volt selama 1,5 jam. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan UV transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera polaroid.

3.6.6.4 Purifikasi Amplikon

Sampel amplikon hasil PCR yang sebagian telah digunakan untuk konfirmasi elektroforesis dimasukkan dalam *microtube* dengan volume maksimum

1500 μ l. Sampel tersebut ditambah dengan sodium asetat (*Merck*) sebanyak 0,1 % dari total volume sampel amplikon dalam *microtube* yang akan dipurifikasi. Berikutnya ditambahkan ethanol absolut dingin sebanyak dua kali volume larutan sodium asetat dan sampel amplikon. Kemudian dilakukan *spin down* dengan menggunakan alat sentrifugasi dan disimpan pada suhu -20°C selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 200 μ l etanol 70% dingin dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 13.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Pelet hasil sentrifugasi ini kemudian dikeringkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 37°C . Pelet yang telah kering ditambah dengan ddH₂O sebanyak 15 μ l.

3.6.6.5 Sequencing (Pengurutan Sekuen) DNA Amplikon

Sequencing atau pengurutan sekuen DNA dilakukan untuk mengetahui sekuen DNA yang mengalami polimorfisme. *Sequencing* dilakukan dengan menggunakan sampel DNA dari hasil PCR yang telah di purifikasi. Pada konfirmasi amplifikasi DNA dengan elektroforesis gel agarosa, pita yang paling tebal dipilih sebagai sampel untuk *sequencing*. Pita yang paling tebal dipilih dengan asumsi bahwa DNA telah dikenali oleh primer yang spesifik dan teramplifikasi dengan panjang sekuen yang sesuai. Tahapan *Sequencing* dilakukan di Laboratorium PT. Genetika Science Indonesia, Kembangan, Jakarta Utara. Hasil dari tahap *sequencing* ini berupa *alignment* yang nantinya dijadikan data pada tahapan pencarian data *basa nucleotida*.

3.6.6.5 Analisis Homology BLAST

Hasil analisis sekuen DNA isolat bakteri terbaik kemudian dibandingkan dengan sekuen DNA pada basis data (*database*) DNA melalui program

pelacakan *database Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information, National Institute for Health, USA* (NCBI, 2018).

3.6.6.6. Analisis Pohon Filogeni

Analisis filogeni bakteri dilakukan dengan membandingkan sekuen 15 bakteri terdekat dengan sekuen 16S rRNA pada *database Gen Bank* ketika melakukan analisis BLAST. Sekuen bakteri asosiasi dari sampel murni yang didapat dicari kekerabatan terdekat menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (Mega) 5. Menurut Tamura *et al.*, (2011), aplikasi Mega dikembangkan dengan tujuan menyediakan sentris biologi, seperangkat alat terpadu untuk analisis statistik data urutan DNA dan protein dari sudut pandang evolusi. Analisis *tools* pada Mega telah diperluas untuk memasukkan metode *maximum likelihood* (ML) untuk analisis evolusi molekuler. MEGA 5 memiliki fitur baru yang ditandai dengan tanda bintang (*). Metode ML untuk menyimpulkan pohon evolusi dan melakukan tes bootstrap untuk keberpihakan nukleotida dan asam amino, karena metode ML menuntut komputasi maka dilakukan penataan ulang topologi dari pohon awal untuk mencari pohon filogeni menggunakan metode ML. Berikut merupakan langkah dalam pengerjaan menggunakan Mega 5;

1. Buka aplikasi Mega 5.
2. Klik tanda *Align*, kemudian pilih *Edit/Built alignment* untuk membuka *window alignment* baru.
3. *Window alignment* baru akan terbuka, klik *Create new alignment* kemudian klik OK.
4. Muncul *Window* dengan pilihan data untuk *alignment*, Klik "DNA" untuk *align* sekuens DNA.

5. Muncul *Window alignment explorer*, untuk memasukkan data sekuens, klik *Sequencer*, lalu pilih *Edit Sequencer File*, pilih data yang akan digunakan dan klik *Open*.
6. Data sekuens akan keluar dalam bentuk *tracer* atau *chromatogram*.
7. Geser *scroll bar* untuk melihat *chromatogram* dengan cepat guna memastikan data sekuens yang digunakan adalah data sekuens dengan *chromatogram* yang baik (dilihat dari puncak chromatogram yang bersih dan tanpa *noise*).
8. Pada *window Trace Editor*, klik *Data*, kemudian pilih *Add to Alignment Explorer* untuk memasukkan data ke dalam window kerja MEGA5 (data *forward sekuens*). Sementara untuk data *reverse sekuens* klik *Edit* kemudian pilih *Reverse Complement* untuk mengubah sekuens menjadi *forward sekuens*, lalu klik *Data* dan pilih *Add to Alignment Explorer*.
9. Pada *window Trace Editor*, klik *Data* kemudian klik *Add to Alignment Explorer*, untuk memasukkan data ke dalam window kerja MEGA5 (untuk data "*forward sekuens*"). Sementara untuk data "*reverse sekuens*". Selanjutnya klik *Edit* dan klik *Reverse Complement* untuk mengubah sekuens menjadi *forward sekuens*, lalu klik *Data* kemudian *Add to Alignment Explorer*.
10. Hapus beberapa basa pertama dan terakhir yang sulit dibaca dari sekuens (terdapat banyak N).
11. Klik *Edit* kemudian pilih *Select All* untuk memilih seluruh sekuens. Lalu klik *Alignment* dan pilih *Align by ClustalW*.
12. Muncul window dengan pilihan parameter "*ClustalW Parameter*" atau kemudian Klik *OK* atau *Compute* untuk menjalankan program.

13. Setelah *alignment*, perhatikan tanda asteriks (*) yang menunjukkan basa yang identik antar sekuens.
14. Tanda asteriks tidak muncul jika ada *missing data* (-) atau saat terdapat basa yang berbeda.
15. Apabila terdapat *missing data* atau basa yang berbeda, cek kembali *chromatogram*, dan pilih sekuens yang menunjukkan chromatogram yang baik, kemudian lakukan pengeditan pada sekuens.
16. Setelah dilakukan pengeditan, dan kedua sekuens dari data *forward* dan *reverse* identik, dipilih hanya salah satu sekuens untuk kemudian dilabel.
17. Untuk membandingkan data sekuens dengan informasi database genetik (*GenBank*), dilakukan proses BLAST dengan cara Klik *Web*, kemudian pilih *Do BLAST Search*.
18. Akan muncul windows baru dengan tampilan BLAST, pada kolom *Search Set*, *Program Selection*, maupun *Parameters* diubah sesuai dengan data yang diinginkan. Setelah dipilih pengaturan yang diinginkan, klik BLAST. Windows baru akan terbuka Tingkat kemiripan sekuens yang kita miliki (*query*) dengan sekuens dari database dapat dilihat dari prosentase *Max ident*.
19. Data dari *GenBank* dapat dimasukkan ke dalam *alignment* data pada *software* Mega 5 dengan cara klik data yang diinginkan, sehingga akan terbuka tampilan window seperti berikut. Klik *Add to Alignment* untuk menambahkan data sekuens.
20. Setelah semua data dimasukkan pada *Alignment* simpan dalam format (.Meg).
21. Pada *Window* Mega 5. Pilih *menu bar Phylogeny* kemudian pilih *Cuntracts/Test Maximum Likelihood Tree*.

22. Muncul *window* baru *Analysis preferences*, Pada kolom *Statistical method* pilih *Maximum likelihood*. Pada *Test of phylogeny* pilih *Bootstrap method* dengan pengulangan 1000 kali. Kemudian klik *Compute* dan tunggu hasil *running* kurang lebih 2-3 jam.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Deskripsi lokasi penelitian

Lokasi penelitian berada di perairan Kondang Merak, tepatnya di kecamatan Bantur , Jawa Timur. Pantai di perairan Kondang Merak merupakan jenis pantai berbatu, dimana banyak ditemukan karang dari jenis *reef flat*, *reef crest*, dan *fore reef*. Pada lokasi penelitian kondisi karang tergolong buruk hingga sedang (Nugraha, 2016). Karang yang berada di perairan Kondang Merak didominasi dari jenis karang *massive*. Hal tersebut karena karang masive mampu bertahan hidup pada lingkungan seperti pada daerah yang memiliki ragam variasi dalam sedimentasi tinggi, daerah yang mempunyai fluktuasi salinitas yang tinggi.

4.2 Data Pendukung parameter perairan Kondang Merak

Parameter lingkungan merupakan suatu aspek penting sebagai data pendukung kualitas air yang mempengaruhi keadaan ekologi kehidupan makhluk hidup di bawah laut salah satunya terumbu karang. Parameter umum yang diketahui sebagai data pendukung penggambaran kualitas perairan laut ialah suhu, pH dan salinitas. Ketiga dari parameter tersebut sebagai tolak ukur kualitas perairan di poin lokasi stasiun pengambilan sampel. Dalam penelitian ini, karang karang sakit yang terinfeksi PLS sangat rentan terhadap lingkungan disekitarnya. Parameter yang dihitung pada saat pengambilan sampel ialah suhu, pH dan salinitas parameter insitu tersebut ialah parameter kualitas air yang sangat berpengaruh pada keberlangsungan hidup berbagai organisme diperairan laut serta menjadi parameter mendasar bagi kualitas perairan laut. Adapun tabel nilai parameter dibandingkan dengan pengukuran pada penelitian terdahulu di perairan Kondang Merak disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbandingan data parameter lingkungan

No.	Parameter	(Lutfi, 2016)	(Herdiutami, 2017)	<i>In situ</i>
1.	Suhu (°C)	27,8	29,9	26,5
2.	pH	8,7	6,78	7,4
3.	Salinitas (‰)	26	35	35

Suhu air yang diperoleh pada pengukuran di lapang berbeda dengan suhu yang diperoleh pada penelitian terdahulu. Hal tersebut dikarenakan perbedaan waktu pengambilan data dimana, pengambilan data yang dilakukan adalah pada bulan November (Lutfi, 2016), pada bulan April (Herdiutami, 2017). Nilai-nilai tersebut masih berada pada kisaran suhu air di perairan laut umumnya, dimana nilai suhu di lapisan permukaan laut yang normal berkisar 20-30°C (Nybakken, 1988). Keadaan suhu ini masih tergolong wajar untuk perairan tropik. Ilahude dan Liasaputra (1980) mengatakan variasi suhu perairan tropik tergolong wajar apabila nilainya berkisar antara 25,6-32,3°C. Parameter suhu air laut mempunyai toleransi terhadap pertumbuhan karang batu (*hard coral*). Untuk pertumbuhan dan perkembangan terumbu karang, suhu yang ideal berkisar antara 25-28°C dan antara 23-29°C (Eliza, 1992). Menurut laporan Kementerian KLH (2004), suhu sesuai untuk kehidupan karang adalah berkisar antara 28-30°C. Sejauh ini, kisaran suhu yang teramati masih dalam batas kisaran optimal suhu air laut yaitu 28-30°C. Secara umum suhu yang diperoleh di perairan ini, baik untuk kehidupan dan reproduksi terumbu karang.

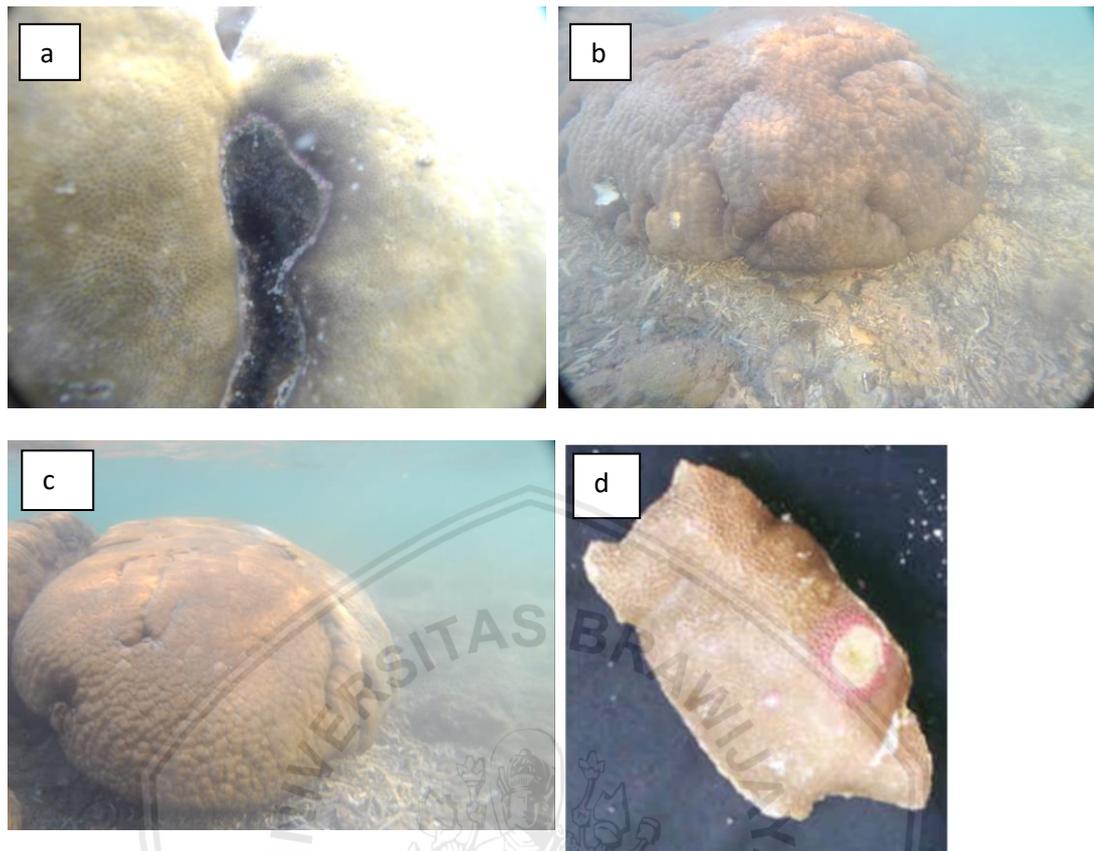
Nilai salinitas air laut di perairan ini memiliki rata-rata 35 ‰. Nilai salinitas pada pengukuran dilapang dibandingkan tahun sebelumnya memiliki nilai yang sama, sedangkan jika dibandingkan dengan tahun 2016 terjadi penurunan yang cukup besar. Hal tersebut karena pada saat pengambilan data oleh Lutfi (2016), dilakukan pada bulan November dimana bulan tersebut merupakan musim hujan, dimana curah hujan semakin besar atau banyak curah hujan di suatu wilayah laut maka salinitas air laut itu akan rendah dan sebaliknya semakin sedikit atau kecil

curah hujan yang turun salinitas akan tinggi. Pengambilan data oleh Herdiutami (2017) dan pengambilan data di lapang merupakan musim kemarau, dimana inputan aliran sungai tidak begitu mempengaruhi salinitas air laut. Romimohtarto dan Thayib (1982) mengemukakan bahwa untuk daerah pesisir salinitas berkisar antara 32-34‰, pada laut terbuka salinitas berkisar 33-37 ‰ dengan rata-rata 35 ‰. *Hard coral* dapat hidup dalam batas salinitas tertentu yaitu antara 25-40 ‰ (Smith *dalam* Sukarno dkk., (1981). Menurut Eliza (1992), salinitas yang ideal untuk per-tumbuhan dan perkembangan karang berkisar antara 25-40 ‰. Demikian pula Nontji *dalam* Sudiarta (1995) menyatakan bahwa hewan karang mempunyai toleransi salinitas berkisar 27-40 ‰.

Variasi nilai derajat keasaman (pH) air laut dapat dijadikan sebagai salah satu identifikasi kualitas air laut. Pada kisaran nilai pH tertentu dapat diindikasikan terjadinya suatu perubahan dalam kualitas perairan. Derajat keasaman (pH) di perairan ini mempunyai rata-rata 7,4. Variasi nilai ini masih dalam batas aman untuk pH suatu perairan. Menurut KLH (2004) menetapkan nilai pH untuk keberlangsungan hidup karang berkisar antara 7-8,5. Menurut Salm (1984), pH di suatu perairan yang normal berkisar antara 8,0-8,3. Dengan demikian pH air laut di perairan ini masih baik untuk kehidupan terumbu karang. Nilai pH yang baik untuk berbagai kepentingan berkisar antara 6-9.

4.3 Hasil pengambilan sampel

Hasil pengambilan sampel koloni karang yang terkena *Pink Line Syndrome* dapat dilihat pada Gambar 3. a) merupakan Stasiun 1, b) Stasiun 2 dan c) Stasiun 3, d) sampel karang terinfeksi PLS menurut Ravindran (2006). Ketiga stasiun ditemukan koloni karang yang terinfeksi PLS.



Gambar 3. Sampel porites lutea yang terinfeksi *Pink Line Syndrome*

4.4 Hasil mikrobiologi

4.4.1 Penanaman Isolat dan Pemurnian Bakteri

Hasil dari penanaman setelah diinkubasi selama 2x24 jam dalam media agar Zobell 2261E pada cawan diperoleh 38 isolat. Isolat hasil penanaman dari larutan pengenceran bertingkat serta keterangan kode sampel dari pengamatan morfologi yaitu ukuran, bentuk, elevasi dan margin dapat dilihat pada Lampiran 1. Diambil jenis koloni berdasarkan jumlah koloni terbanyak dari hasil yang diperoleh seperti pada Lampiran 2. yang mana dari proses tersebut diambil 7 untuk dilakukan ke tahap identifikasi secara molekuler. Berikut adalah hasil pengamatan bakteri secara morfologi,

1. Ukuran
 - a. *Point*

Jenis bakteri ukuran *Point* (titik) terdapat pada 7 isolat dari 38 isolat yang diamati. Rata-rata isolat bakteri ukuran poin yang ditemukan dari hasil pengamatan memiliki diameter tidak lebih dari 1 mm. Contoh dari isolat *point* dapat dilihat pada Gambar 4.

a. *Moderate*

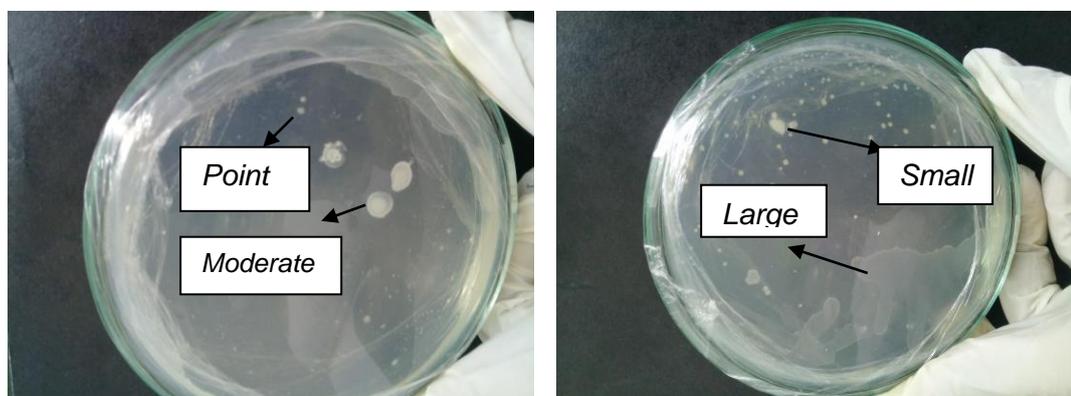
Jenis bakteri ukuran *Moderate* (sedang) terdapat pada 9 isolat dari 38 isolat yang diamati. Rata-rata isolat bakteri ukuran moderate yang ditemukan dari hasil pengamatan memiliki diameter tidak lebih dari 10 mm dan tidak kurang dari 5 mm. Contoh dari isolat *Moderate* dapat dilihat pada Gambar 4.

b. *Small*

Bakteri ukuran *small* (kecil) ditemukan pada 10 dari 38 isolat bakteri yang diamati. Diameter dari isolat bakteri ukuran small yang ditemukan pada pengamatan kurang dari 5 mm. Contoh dari isolat *small* dapat dilihat pada Gambar 4.

c. *Large*

Bakteri ukuran *Large* (besar) hanya ditemukan pada 5 dari 38 isolat yang ada. Diameter dari isolat bakteri ukuran large yang ditemukan pada pengamatan lebih dari 10 mm. Contoh dari isolat *large* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengamatan morfologi ukuran koloni bakteri

2. Bentuk

a. *Circular*

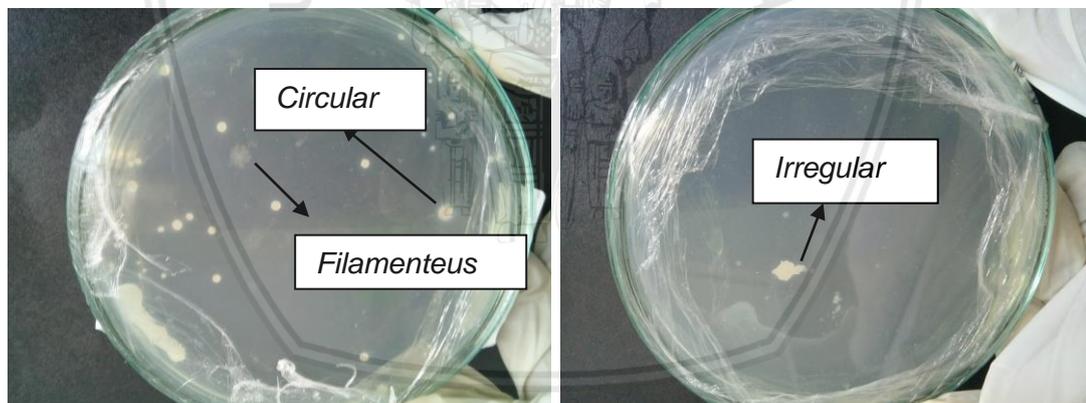
Isolat bakteri yang tergolong dalam bentuk *Circular* (beraturan) ditemukan pada 15 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *circular* dapat dilihat pada Gambar 5.

b. *Irregular*

Isolat bakteri yang tergolong dalam bentuk *Irregular* (tidak beraturan) ditemukan pada 17 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *irregular* dapat dilihat pada Gambar 5.

c. *Filamentous*

Isolat bakteri yang tergolong dalam bentuk *Filamentous* ditemukan pada 1 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *filamentous* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengamatan morfologi bentuk koloni bakteri

3. Elevasi

a. *Flat*

Isolat bakteri yang tergolong dalam elevasi *flat* dengan ketinggian tidak terukur, nyaris rata dengan medium ditemukan pada 5 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *flat* dapat dilihat pada Gambar 6.

b. *Raised*

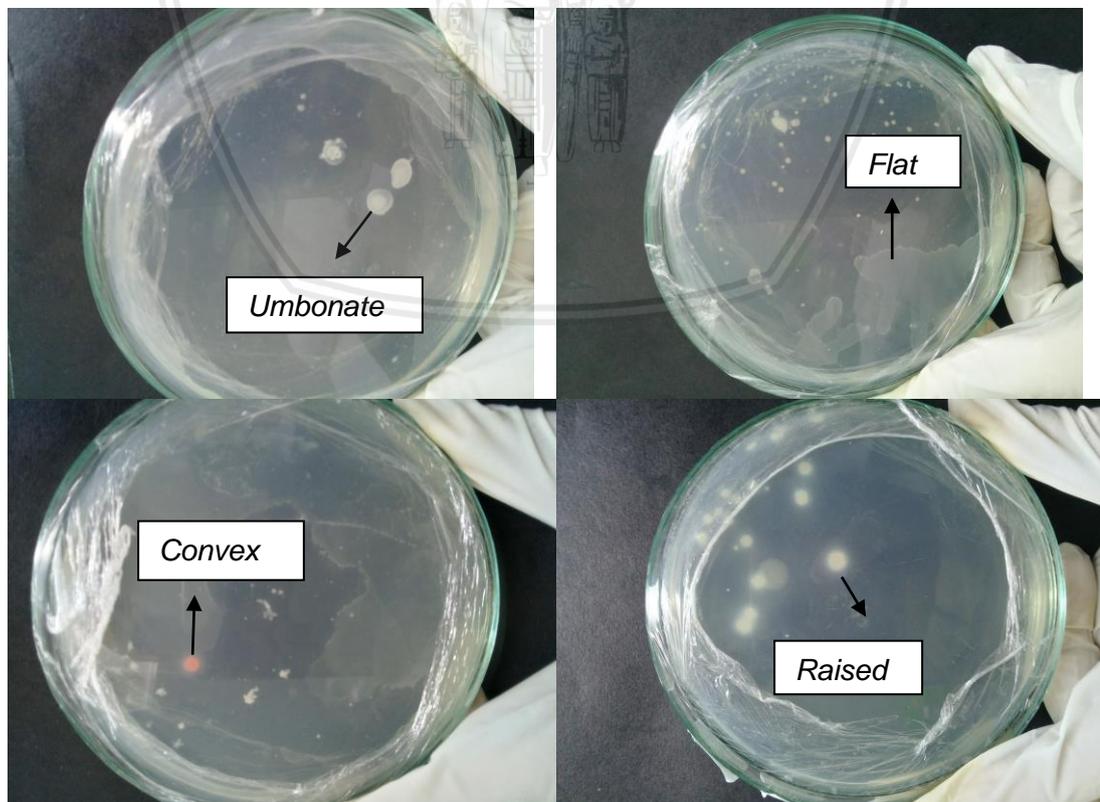
Isolat bakteri yang tergolong dalam elevasi *raised* dengan ketinggian nyata terlihat, namun rata pada seluruh permukaan ditemukan pada 17 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *raised* dapat dilihat pada Gambar 6.

c. *Umbonate*

Isolat bakteri yang tergolong dalam elevasi *umbonate* dengan bentuk cembung dibagian tengah lebih menonjol ditemukan pada 5 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *umbonate* dapat dilihat pada Gambar 6.

d. *Convex*

Isolat bakteri yang tergolong dalam elevasi *convex* dengan bentuk cembung seperti tetesan air ditemukan pada 3 dari 38 isolat yang diamati. Gambar dari isolat bakteri *convex* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengamatan morfologi elevasi koloni bakteri

4. Margin

a. *Lobate*

Isolat bakteri yang tergolong dalam margin *lobate* dengan tepian berlekuk ditemukan pada 8 dari 38 isolat yang diamati. Contoh dari isolat margin *lobate* dapat dilihat pada Gambar 7.

b. *Serate*

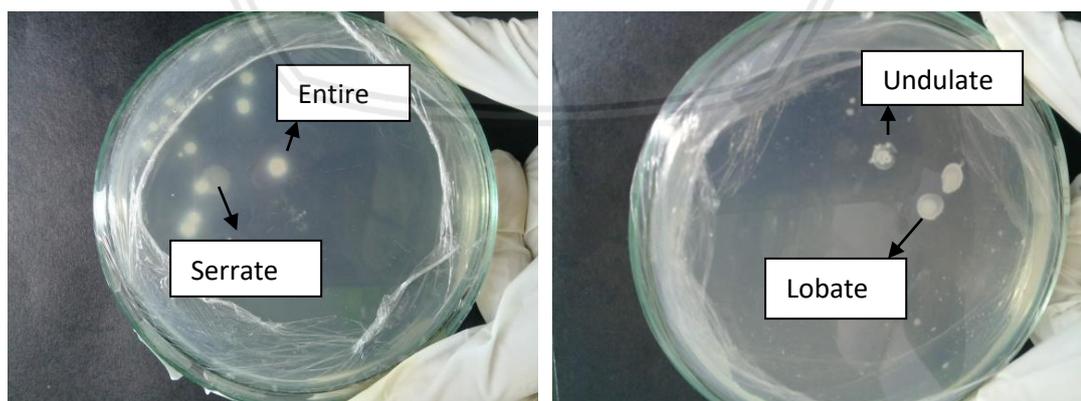
Isolat bakteri yang tergolong dalam margin *serate* dengan tepian bergerigi ditemukan pada 4 dari 38 isolat yang diamati. Contoh dari isolat margin *serate* dapat dilihat pada Gambar 7.

c. *Undulate*

Isolat bakteri yang tergolong dalam margin *undulate* dengan tepian bergelombang ditemukan pada 7 dari 38 isolat yang diamati. Contoh dari isolat margin *undulate* dapat dilihat pada Gambar 7.

d. *Entire*

Isolat bakteri yang tergolong dalam margin *entire* dengan tepian rata ditemukan pada 15 dari 38 isolat yang diamati. Contoh dari isolat margin *entire* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengamatan morfologi margin koloni bakteri

4.4.2 Hasil pemurnian dan pematangan isolat bakteri

Hasil pengamatan yang dilakukan secara visual dari isolat yang ditanam diperoleh data morfologi untuk setiap isolat seperti yang tersaji pada Lampiran 1.

Selanjutnya dipilih 20 isolat yang berbeda (Tabel 6), untuk dilakukan pemurnian dengan metode *zigzag strak plate* (Lampiran 3), dimana pola inokulasi ini biasanya dilakukan ketika sampel tidak memiliki kepadatan sel yang tinggi (Leboffe, 2012). Dari 20 isolat tersebut selanjutnya diambil 7 isolat yang dominan untuk diidentifikasi secara molekuler, karena pada saat penanaman terjadi kompetisi pada media agar maka diasumsikan bahwa ke 7 isolat tersebut yang paling *representatif* (Joint *et al.*, 2010). Nilai prosentase dominan diperoleh dari jumlah frekuensi dari setiap isolat yang berbeda dibagi dengan jumlah frekuensi yang ada dikalikan 100%.

Tabel 6. Hasil pemurnian bakteri

No.	ISOLAT	S1	S2	S3	Σ frekuensi	Prosentase
1.	LIFU	3	0	1	4	10%
2.	PCRE	1	2	1	4	10%
3.	SCRE	2	2	0	4	10%
4.	SIRL	2	2	0	4	10%
5.	SCUE	0	2	1	3	8%
6.	MIRS	2	1	0	3	8%
7.	MCCE	1	1	1	3	8%
8.	MIRL	1	1	0	2	5%
9.	MIUL	1	0	0	1	3%
10.	PCRU	1	0	0	1	3%
11.	LIFL	1	0	0	1	3%
12.	PCUE	0	1	0	1	3%
13.	MCFE	1	0	0	1	3%
14.	SIRS	1	0	0	1	3%
15.	PIRU	1	0	0	1	3%
16.	MIRU	1	0	0	1	3%
17.	PCFE	1	0	0	1	3%
18.	SFRF	0	1	0	1	3%
19.	MIUU	0	1	0	1	3%
20.	LIRU	0	1	0	1	3%

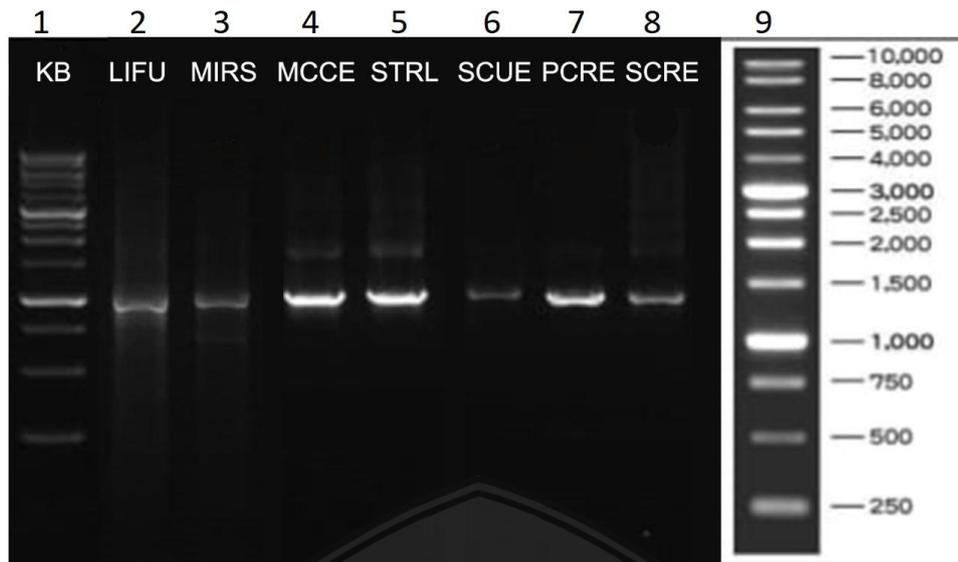
Peremajaan bakteri dilakukan ketika media tanam sudah tidak mempunyai nutrient yang digunakan oleh bakteri untuk berkembang biak. Pada penelitian ini peremajaan dilakukan di media agar miring *marine zobell 2216E*.

Sampel dominan di remajakan seperti pada Lampiran 4. Hasil peremajaan bakteri

4.5 Hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Hasil PCR isolat dominan yang diperoleh selanjutnya dilakukan pembacaan di elektroforesis menggunakan *UV transilluminator*. Hasil elektroforesis disajikan pada Gambar 8. Hasil elektroforesis DNA menunjukkan adanya pita tebal dan pita tipis. DNA yang utuh ditandai dengan tidak adanya smear DNA yang dielektroforesis yaitu pita terlihat tebal dan jelas. Akan tetapi beberapa isolat DNA memiliki pita DNA yang tidak tebal. Kejadian ini dapat terjadi karena kesalahan teknis saat pengambilan sampel dari lapang, sehingga akan mempengaruhi hasil dari isolasi DNA. DNA yang diperoleh rusak atau sudah terfragmentasi dapat menghasilkan pita DNA tampak smear, tipis dan tidak jelas (Novitasari *et al.*, 2014).

Pada penelitian sampel yang digunakan menghasilkan pita sesuai dengan ukuran pasang basa basa untuk mengidentifikasi gen 16S rRNA yaitu dengan kisaran 1.500 pasang basa. Ini menunjukkan bahwa primer serta kondisi PCR yang digunakan dapat mengamplifikasi amplikon dengan baik sesuai dengan target gen 16S rRNA (Lauroa *et al.* 2009).



Gambar 8. Hasil elektroforesis 7 isolat

Keterangan : 1. Marker DNA (1 kb Plus DNA Leader), 2-8. Sampel DNA bakteri dan 9. Keterangan garis

Menurut Irmawati (2003), pita DNA yang tebal dan mengumpul (tidak menyebar) menunjukkan konsentrasi yang tinggi dan DNA total yang di ekstrak dalam kondisi utuh, sedangkan pita DNA yang terlihat menyebar menunjukkan adanya ikatan antar molekul DNA yang terputus pada saat proses ekstraksi berlangsung, sehingga genom DNA terpotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil. Terputusnya ikatan antar molekul tersebut dapat disebabkan oleh adanya gerakan fisik yang berlebihan yang dapat terjadi dalam proses pemipetan, pada saat dibolak-balik dalam *ependorf*, disentrifius atau bahkan temperature yang terlalu tinggi dan karena aktivitas bahan-bahan kimia tertentu. *Smear* yang muncul menandakan adanya materi selain DNA yang ikut terisolasi (Anam, 2010).

4.6 Hasil Squencing dan BLAST

Hasil dari isolat karang yang teramplifikasi PCR di atas di tindak lanjuti dengan analisis molekuler (*sequencing*) guna mengetahui identitas isolat tersebut. Melalui hasil sequencing akan didapatkan data berupa *elektroforegram*

dan urutan untai basa nukleotida. Susunan basa *nucleotida* (sequence) tersebut selanjutnya dilakukan identifikasi dengan membandingkan *sequence* yang diperoleh dengan data *sequence* di Gene Bank (BLAST).

Primer yang digunakan untuk mengidentifikasi kedua isolat yang diteliti merupakan primer universal bakteri 16S rRNA dengan target *sequence* sebesar 1000 bp. *Sequence* 16S rRNA mempunyai daerah sekuen yang terkonservasi, sehingga mutasi akan terbatas dan dapat mengklasifikasikan bakteri pada tingkat famili, genus maupun spesies. Hasil sekuen 16S rRNA dapat digunakan untuk menduga hubungan kekerabatan secara alami antara spesies yang mempunyai hubungan kekerabatan jauh serta dapat digunakan untuk membedakan spesies yang mempunyai kekerabatan dekat dari berbagai daerah (Sabdono and Radjasa, 2006).

Hasil identifikasi dilakukan membandingkan *sequence* yang diperoleh dengan data *sequence* di *Gene Bank* (BLAST) mendapatkan hasil seperti yang terjadi pada Tabel 7. Informasi yang dapat diperoleh dari BLAST berupa *score query coverage*, *E-value*, *Max identity* dan nama spesies dari *sequence* beserta kekerabatan terdekatnya. Pada Tabel 7, terdapat 7 isolat yang diidentifikasi menggunakan BLAST dimana satu diantaranya memiliki nilai *Max score* dan *total score* yang rendah yaitu *Rodhococcus sp*, sedangkan isolat yang lain memiliki nilai *Max Score* dan *Total Score* antara 1000-2500. Jika urutan target dalam database mencakup seluruh urutan query, maka query cover memiliki nilai 100%. Hasil identifikasi ke-7 isolat tersebut terdapat 2 isolat yang memiliki nilai query cover dibawah 100%. Nilai tersebut mempengaruhi nilai Persentase identitas, karena Persentase Identitas adalah angka yang menggambarkan seberapa mirip urutan query dengan urutan target. Berapa banyak karakter dalam setiap urutan yang identik, dimana smakin tinggi identitas persen maka semakin signifikan

pertandingannya. Nilai E-value dari semua isolat yang diamati bernilai 0.0, maka semakin signifikan kecocokannya (NCBI, 2018).

Tabel 7. Hasil BLAST

Kode isolate	Hasil Blast	Max Score	Total Score	Query Cover	E- Value	Ident	Panjang Bp
LIFU	<i>Bacillus sp.</i>	2507	2507	100%	0,0	99%	1500
MIRS	<i>Rhodococcus sp.</i>	915	915	86%	0,0	83%	1000
MCCE	<i>Staphylococcus arlettae</i>	2526	2526	100%	0,0	100%	1400
SIRL	<i>Lysinbacillus macrolides</i>	2538	2538	100%	0,0	100%	1410
SCUE	<i>Bacillus subtilis</i>	2397	2397	100%	0,0	100%	1329
PCRE	<i>Staphylococcus arlettae</i>	2471	2471	100%	0,0	100%	1370
SCRE	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1587	1587	98%	0,0	90%	1396

Menurut Sagita (2016), score adalah jumlah keselarasan semua segmen dari urutan database yang cocok dengan urutan nukleotida. Nilai skor menunjukkan keakuratan nilai penjajaran sequence berupa nukleotida yang tidak diketahui dengan sekuens nukleotida yang terdapat di dalam *Gene Bank*. Semakin tinggi nilai skor yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sequence. *Query coverage* adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST, sedangkan *max identity* adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan. Nilai *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Nilai *E-value* yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antar sequence semakin rendah, sedangkan nilai *E-value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sequence semakin tinggi. Nilai *E-value* bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut identik. Hasil BLAST secara khusus untuk setiap isolat dapat dilihat pada Lampiran 6.

Hasil BLAST menunjukkan bahwa untai nukleotida dari isolat LIFU sepanjang 1500 bp (base pairs) memiliki kekerabatan terdekat sebesar 100% dengan spesies *Bacillus* sp. Isolat SCUE memiliki untai nukleotida sepanjang 1329 bp (base pairs) memiliki kekerabatan terdekat sebesar 100% dengan spesies *Bacillus subtilis*. Menurut Ahila *et al.* (2017), spesies bakteri *Bacillus* sp. berasosiasi dengan *P. lutea* diketahui bahwa identitas bakteri tersebut adalah *Bacillus* sp. *Bacillus* sp. merupakan bakteri antagonis. Skrining metabolit sekunder menekankan bahwa ekstrak etil asetat *B. subtilis* menunjukkan efek antagonis yang kuat. Namun Rahmaningsih *et al.* (2012), menyatakan bahwa *Bacillus subtilis* bukanlah bakteri yang bersifat patogen. Bakteri ini mampu mendegradasi lemak dalam limbah cair dengan cara mengeluarkan enzim ekstraseluler walaupun dalam keadaan rendah oksigen.

Bacillus subtilis merupakan bakteri mesofilik, aerobik dan merupakan anggota gram-positif. Peptidoglikan bakteri ini mengandung berbagai variasi peptida. Hidup pada pH 6.0 dalam *acetyl-methylcarbinol*, gelatin terhidrolisis dan mampu menghidrolisis pati dan mereduksi nitrat menjadi nitrit (Rohkayati, 2009). Spesies *Bacillus* sp. merupakan salah satu mikroba penghasil enzim protease yang bermanfaat (Efendi *et al.*, 2017), memiliki karakter *ubiquitous*, artinya dia bisa ditemukan dimana-mana. Bakteri ini punya kemampuan untuk hidup pada lingkungan yang kurang menguntungkan/ kurang cocok (*adverse environment*), karena mempunyai *fleksibilitas* metabolisme yang baik. *B. subtilis* merupakan spesies yang paling banyak berasosiasi dengan sponges, ascidians, karang lunak, serta mereka juga dapat ditemukan di kolom perairan air laut yang berpotensi sebagai anti-patogen karena mampu menghasilkan bioaktif (Tomova *et al.*, 1999).

Isolat MIRS memiliki untai nukleotida sepanjang 1000 bp (base pairs) memiliki kekerabatan terdekat sebesar 86% dengan spesies *Rhodococcus* sp. *R.*

pyridinovorans mampu menghasilkan enzim nitril-hidratase. *Rhodococcus* merupakan genus bakteri gram positif, *non-motil*, tidak menghasilkan spora dan bersifat aerob. *Rhodococcus* tumbuh cepat dan siklus perkembangannya relatif sederhana. *Rhodococcus sp.* memiliki kemampuan dalam menghidrolis senyawa nitril dalam bentuk alifatik dan aromatik. Beberapa pustaka menginformasikan bahwa beberapa strain *Rhodococcus* mampu mendegradasi senyawa-senyawa toksik yang bersifat karsinogenik, misalnya piridin, stiren, biphenil (Riffiani dan Nunik, 2017). *Rhodococcus* berasal dari filum Actinomycetes hidup melimpah di lingkungan darat maupun laut seperti di tanah, sedimen laut dalam, tumbuhan, serangga, dan invertebrata laut. *Rhodococcus* mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Kemunculan *Rhodococcus* yang meluas dan terus-menerus di tanah diindikasikan bahwa *Rhodococcus* cenderung memainkan peran penting dalam adanya polutan organik di lingkungan dan berguna untuk perawatan tanah atau limbah yang terkontaminasi (Bell *et al.*, 1999). Namun, menurut Crespy *et al.*, (1992) dalam Bell *et al.*, (1998) menyebutkan bahwa adanya *Rhodococcus* menyebabkan infeksi yang menghasilkan kelainan pertumbuhan seperti hilangnya jaringan dan pertumbuhan yang membentuk *leafy galls* pada tanaman. Hal ini dikarenakan *cykitin* yang diproduksi oleh bakteri.

Isolat MCCE memiliki unta nukleotida sepanjang 1400bp (base pairs) dan PCRE sepanjang 1370 bp memiliki kekerabatan terdekat sebesar 100% dengan spesies *Staphylococcus arlettae*. *Staphylococcus* merupakan sel gram positif berbentuk bulat biasanya tersusun dalam bentuk kluster yang tidak teratur seperti anggur. *Staphylococcus* tumbuh dengan cepat pada beberapa tipe media dan dengan aktif melakukan metabolisme, melakukan fermentasi karbohidrat dan menghasilkan bermacam-macam pigmen dari warna putih hingga kuning gelap (Fatmawati, 2015). Wilson *et al.* (2012) menyatakan bahwa belum ada laporan bahwa *Staphylococcus sp.* menyebabkan penyakit di karang. Anggota genus

Staphylococcus lebih sering dianggap sebagai organisme terestrial yang di temukan di dalam atau permukaan tanah dimana kehadiran mereka di lingkungan laut tidak biasa. Adanya *Staphylococcus* pada hasil penelitian dimungkinkan posisi pada saat pengambilan sampel yang sangat dekat dengan pantai, diduga membawa limpasan dari daratan sehingga akan mengangkut tanah permukaan dan mikroorganisme yang terkait seperti halnya *Staphylococcus sp.* ke terumbu. *Staphylococcus sp.* merupakan bakteri yang dapat menginfeksi kulit dan menyebabkan penyakit pioderma (Putri *et al.*, 2018).

Isolat S1RL memiliki panjang untai nukleotida sepanjang 1410 bp (base pairs) memiliki kekerabatan terdekat sebesar 100% dengan spesies *Lysinibacillus macroides*. *Lysinibacillus* adalah genus bakteri gram-positif dan berbentuk batang dan termasuk dalam famili *Bacillaceae*. Organisme dalam genus ini sebelumnya dianggap sebagai anggota genus *Bacillus*, tetapi status taksonomi dari mikroorganisme ini, yaitu, kelompok rRNA 2 dari genus *Bacillus*, diubah ke genus *Lysinibacillus* pada tahun 2007. Isolat dari genus *Lysinibacillus* adalah agen kontrol biologis potensial untuk penyakit yang mempengaruhi kakao. Strain *Lysinibacillus* ini akan bersifat menguntungkan dalam industri farmasi. Dengan mempertimbangkan ruang lingkup bakteri laut dan sifat mikroorganisme laut (Abideen dan Manickam, 2014). Spesies ini tidak dilaporkan untuk produsen senyawa bioaktif sejauh ini. Umumnya ditemukan di tanah, dan telah berhasil diisolasi dari jaringan tumbuhan, dan dari produk fermentasi biji tumbuhan serta dari liver ikan puffer. *Lysinibacillus* merupakan bakteri asosiasi karang yang diduga berkontribusi pada nutrisi karang melalui siklus biokimia senyawa nitrogen, karbon, dan sulfur. Bakteri pada karang berperan sebagai pembatas (*barrier*) secara ekologis maupun fisik terhadap masuknya patogen dan menghasilkan senyawa antibakteri yang mencegah dominansi bakteri patogen

tertentu. Strain *L. xylanilyticus* XDB9T dilaporkan sebagai bakteri pengurai (Mien, 2014).

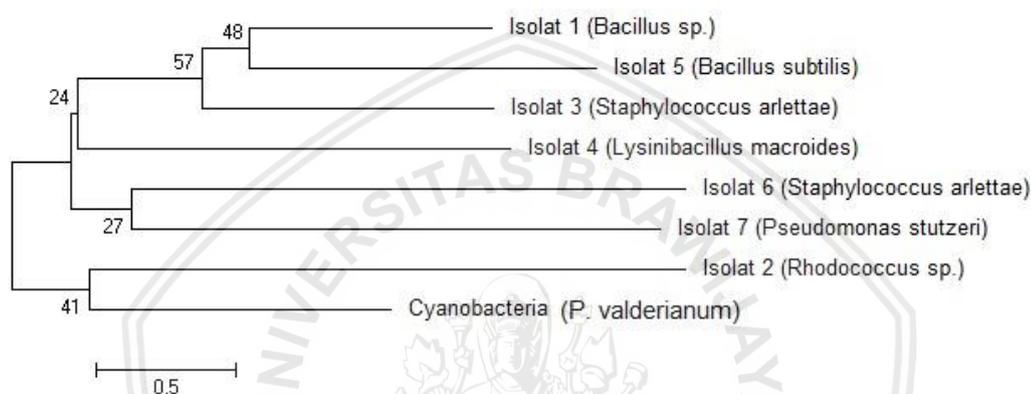
Isolat SCRE memiliki untai nukleotida sepanjang 1396bp (base pairs) memiliki kekerabatan terdekat sebesar 97% dengan spesies *Pseudomonas stutzeri*. *P. stutzeri* `superspecies' dianggap salah satu kelompok denitrifikasi paling aktif dari bakteri heterotrofik. *P. stutzeri* mampu mengoksidasi tiosulfat menjadi tetrathionate baik secara aerobik maupun anaerob. Bakteri yang ini penting dalam pembentukan atau pelepasan tiosulfat di lingkungan laut (Yu *et al.*, 1999). Menurut Lalucat *et al.* (2006), strain bakteri yang berasal dari laut, harus memiliki karakteristik fisiologis setidaknya menoleransi NaCl. *Pseudomonas stutzeri* termasuk strain yang ditanam pada media zobell tampaknya benar spesies yang berasal dari laut. Biasanya bakteri ini terdapat di kolam air atau sedimen. *Pseudomonas* sp. Yang berasosiasi dengan karang bersifat anti-patogen karena mampu menghasilkan senyawa bioaktif, khususnya terhadap streptococcus.

4.7 Pohon Filogeni Kekerabatan Isolat Bakteri

Berdasarkan hasil BLAST, isolat hasil molekuler dicari kekerabatannya selanjutnya dilakukan analisis filogeni dengan menggunakan data sequence masing –masing isolat dengan data di beberapa file informasi genetik isolat bakteri yang berkerabat menggunakan *software* MEGA 5.

Teknik dalam mengidentifikasi bakteri berbasis sequence, umumnya menggunakan informasi berupa gen pengkode spesifik. Filogeni sangat bermanfaat dalam mengetahui diversitas biologis, menyusun klasifikasi, dan menjelaskan fenomena yang terjadi selama proses evolusi Informasi kekerabatan (Emerson *et al.*, 2008).

Pembuatan pohon filogeni dalam penelitian ini dilakukan dengan metode Maximum Likelihood Tree. Menurut Yang and Rannala (2012), Maximum Likelihood merupakan metode statistik berbasis karakter yang membandingkan seluruh sequence dalam penyejajaran untuk memperhitungkan nilai kemungkinan pada setiap pohon filogeni. Adapun pohon filogeni dari ke 7 isolat dominan tersaji pada Gambar 9.



Gambar 9. Pohon filogeni isolat dominan

Hasil pohon filogeni berdasarkan metode *maximum likelihood* dari ke-7 isolat yang diamati tersaji pada Gambar 9. diketahui bahwa nilai paling rendah pada selang kepercayaan adalah 24% sedangkan nilai tertinggi selang kepercayaan hasil rekonstruksi pohon filogeni sebesar 57% dengan skala 0,5. Menurut Hedges (1992) dalam Hillis dan Bull (1993), disarankan untuk melakukan pengulangan *bootstrap* sebanyak 400-2000. Faktor-faktor yang mempengaruhi kinerja bootstrapping tergantung pada penggunaan yang diterapkan. Jika seseorang hanya menginginkan ukuran yang tepat dari proporsi bootstrap, tanpa adanya hubungan antara nilai tersebut dan ukuran pengulangan atau akurasi apa pun, maka hanya jumlah iterasi bootstrap yang menjadi perhatian Penelitian ini melakukan pengulangan sebanyak 1000 kali dengan hasil 24-57%.

Felsenstein (1985) dalam Soltis dan Soltis (2003) menyatakan bahwa nilai-nilai bootstrap 95% atau lebih dianggap signifikan secara statistik dan menunjukkan "*support*" untuk clade, namun dapat ditolak (tidak signifikan) jika terjadi kurang dari 5% dari perkiraan bootstrap. Kemungkinan nilai yang dihasilkan dari bootstrap pada penelitian ini diakibatkan oleh kecermatan dalam menentukan karakter dan ketepatan memilih metode pada saat proses rekonstruksi pohon filogeneti (Muzzazinah, 2017). Nilai bootstrap merupakan untuk menguji seberapa baik set data model yang kita gunakan. Jika nilai bootstrap rendah maka sekuen seharusnya dikeluarkan dari analisis untuk mendapatkan sebuah pohon filogeni yang dapat dipercaya (Dharmayanti, 2011).

Pada rekontruksi pohon filogeni ini ditambahkan out grup data Genbank dari *Cyanobacteria*. Hasil yang didapatkan *Cyanobacteria* berada pada percabangan yang lebih berkerabat dengan *Rhodococcus sp.* Pada penelitian Raghukumar (2006), mengatakan bahwa ada indikasi PLS disebabkan oleh *Cyanobacterium* jenis *P. valderianum* yang mengendap di koloni karang. Oleh karena itu *Cyanobacteria* digunakan sebagai *outgroup* pada pembentukan pohon filogeni. Konsentrasi CO₂ yang lebih tinggi membuat *Zoxanthellae* tumbuh dan berkembang memanfaatkan fotosintat dari CCM *Cyanobacterium* yang berubah menjadi sumber Ci. Akibatnya, inang kehilangan fotosintat karena dialihkan dan dibagi kepada *Zoxanthellae* yang menyebabkan pertumbuhan polip terhambat. Lingkungan yang asam akibat adanya pelepasan CO₂ membuat polip karang mati dan erosi tulang. Efek dari sinergitas CO₂ lingkungan dan lingkungan asam disekitar polip membuat warna merah jambu pada inang. Menurut Crespy *et al.*, (1992) dalam Bell *et al.*, (1998) adanya *Rhodococcus* menyebabkan infeksi yang menghasilkan kelainan pertumbuhan seperti hilangnya jaringan dan pertumbuhan yang membentuk *leafy gals* pada tumbuhan. Hal ini dikarenakan *cykitin* yang diproduksi oleh bakteri.

Meskipun nilai *bootstrap* untuk semua bakteri yang teridentifikasi kurang dari 95%, dari Gambar 9. dapat dilihat terdapat 2 *clade*/grup dimana hanya 1 spesies yang lebih dekat dengan *outgroup* sedangkan spesies yang lain membentuk *clade*/grup tersendiri. Spesies yang membentuk *clade*/grup dengan spesies *outgroup* kemungkinan menyebabkan/agen penyakit karena memiliki hubungan kekerabatan dengan *outgroup* (*Cyanobacteria*) yang sudah diindikasikan menjadi agen penyebab PLS.

Hasil bakteri yang ditemukan pada penelitian ini lebih banyak bersifat non patogen, kemungkinan besar karena pemilihan sampel yang diujikan untuk molekuler ialah isolat yang paling dominan. Pada saat karang sakit, *zoxanthellae* yang berada di dalam karang berjumlah sedikit, hal ini mempengaruhi kehidupan karang karena sebagian besar hasil fotosintesis dari *zoxanthellae* dimanfaatkan oleh karang. Pada kondisi ini karang yang kekurangan nutrisi memakan bakteri di sekitarnya yang banyak mengandung protein dan plankton ukuran pico (di bawah 2 mikron) atau plankton ukuran nano (20-20 mikron), seperti pada saat terjadinya PLS (suhu air tinggi). Komposisi pasokan makanan ini kira-kira 50-60% cyanobacteria, 30% mikroba lain dan 10% diatom (Mitsubishi Corporation, 2011). Menurut Abdel-Salam *et al.* (2004), PLS tidak harus disebabkan oleh patogen tertentu, namun adanya *Cyanobacteria* berpotensi menjadi agen pengganggu inang yang terinfeksi PLS.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kesimpulan yang dapat ditarik adalah:

1. Hasil identifikasi bakteri secara molekuler antara lain, isolat LIFU dengan panjang 1000bp 100% anggota dari genus *Bacillus sp.* (accession number gi|902761045|LC065148.1), sampel MIRS dengan panjang 1000bp 86% anggota dari genus *Rhodococcus sp.* (accession number gi|144601480E|F494201.1), Sampel MCCE dengan panjang 1400bp 100% anggota dari species *Staphylococcus arlettae* (accession number MH012169.1), sampel SIRL dengan panjang 1410bp 100% anggota dari species *Lysinibacillus macroides* (accession number MF170826.1), sampel SCUE dengan panjang 1329bp 100% anggota dari spesies *Bacillus subtilis* (accession number MH542292.1), sampel PCRE dengan panjang 1370bp 100% anggota dari spesies *Staphylococcus arlettae* (accession number MH012169.1) dan sampel SCORE dengan panjang 1396 97% anggota dari spesie *Pseudomonas stutzeri* (accession number gi|917461701|KT380573.1)
2. Hasil pohon filogeni menunjukkan adanya 2 *clade/grup*, dimana ketika ditambahkan *outgrup* (*Cyanobacteria*) hanya spesies *Rhodococcus sp.* yang berkerabat dengan *outgrup* sedangkan spesies yang lain membentuk *clade/grup* tersendiri.

5.2 Kendala dan Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya perlu diperhatikan pemilihan waktu pada saata pengambilan sampel sampai dengan pengolahan di laboratorium, agar tidak tumpang tindih dengan hari libur laboratorium

2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai bakteri yang bersosiasi dengan karang *Porites lutea* yang terkena *Pink Line syndrome*, apakah bakteri yang telah ditemukan menjadi agen anti patogen pada karang, terutama karang *P. Lutea* terkena *Pink Line Syndrome*.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Salam, H.A., Shima Y. Hanafi, Dalia S. Hamza, Abdel-Hamid A.M. Ali. 2014. *Pink line syndrome in Porites lobata* from El-Ain El-Sukhna, Gulf of Suez, Red Sea. *Int. J. Dev.* 3, 23–33.
- Abideen, S. dan Manickam Babuselvam. 2014. Antagonistic activity of *Lysinibacillus fusiformis* n 139 strain isolated from marine fish *Triacanthus strigilifer* and genome sequence. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3, 1066-1072.
- Ahila, N.K., S. Prakash, B. Manikandan, J. Ravindran, N.M. Prabhu, E. Kannapiran. 2017. Bio-prospecting of coral (*Porites lutea*) mucus associated bacteria, Palk Bay reefs, Southeast coast of India. *Microb. Pathog.* 17, 1–28.
- Anam, Khairul. 2010. Isolasi DNA Genom. Bandung: IPB. Thesis.
- Arisandi, A., Badrud Tamam, Raini Yuliandari. 2016. Jumlah Koloni pada Media Kultur Bakteri yang Berasal dari Thallus Dan Perairan Sentra Budidaya *Kappaphycus Alvarezii* di Sumenep. *J. Rekayasa* 9, 43–49.
- Asadi, M.A., Bambang Semedi, Muliawati Handayani, Umi Zakiyah. 2017. Molecular characteristic of bacteria associated with healthy *Porites lutea* coral of South Malang Waters, Indonesia. *J. Biology Environmental Sci.* 11, 244–250.
- Bell, K.S., J.C. Philp, D.W.J. Aw dan N. Christofi. 1998. The genus *Rhodococcus*. 1998. *J.of Applied Microbiology* . 85, 195–210.
- Bell, K.S., M.S. Kuyukina, S. Heidbrink, J.C. Philp, D.W.J. Aw, I.B. Ivshina dan N. Christofi. 1999. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 472–480.
- Boleng, D.T.. 2015. *Bakteriologi Konsep-konsep dasar*. Malang: UM Press.
- Chippindale, P.T., Varshal K. Dave, Donald H. Whitmore, James V. Robinson. 1999. Phylogenetic Relationship of North American Damselflies of the Genus *Ischnura* (Odonata: Zygoptera: Coenagrionidae) Based on Sequences of Three Mitochondrial Genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 110–121.
- Colpaert, N., S. Cavers, E. Bandou, H. Caron, G. Gheysen, J. Lowe. 2005. Sampling Tissue for DNA Analysis of Trees: Trunk Cambium as an Alternative to Canopy Leaves. *Silvae Genet.* 54, 265–269.
- Dharmayanti, Indi N.L.P. 2011. Filogenia Molekuler: Metode Taksonomi organisme Berdasarkan Sejarah evolusi. *Wartazoa*. 21, 1-10.
- Dwidjoseputro, D. 1981. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Djambatan.

- Efendi, Yempita., Yusra dan Vivi Oktavianis Efendi. 2017. Optimasi Potensi Bakteri *Bacillus subtilis* Sebagai Sumber Enzim Protease. *J. Akuatika Indonesia*. 1, 87-94.
- Eliza, 1992. Dampak Pariwisata Terhadap Terumbu Karang. *J. Lingkung. Dan Pengemb.* Vol.12: 150–170.
- Emerson, D., Liane Agulto, Henry Liu, Liping Liu. 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience*. 58, 295–233.
- Fatmawati, Andi. 2015. Uji Aktivitas Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton sp.* terhadap *Staphylococcus aureus*. Makassar: Akademi Analisis Kesehatan. Skripsi.
- Hadikusumah dan Sugiarto. 2001. Penelitian Sumberdaya Laut di Kawasan Pengelola dan Pengembangan Laut (KAPPEL) Sulawesi Utara. Bidang Oseanografi, Proyek Pengembangan dan Penerapan IPTEK Kelautan. Laporan Akhir. Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia : 1-21.
- Hazrul, Ratna Diyah Palupi, Romy Ketjulan, 2016. Identifikasi Penyakit Karang (*Scleractinia*) Di Perairan Pulau Sponda Laut, Sulawesi Tenggara. *Sapa Laut*. Vol. 1 : 32–41.
- Herdiutami, M., 2017. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Endosimbion Pada Karang *Porites* Sehat Dan Terinfeksi White Syndrome Di Perairan Kondang Merak – Malang Selatan. Brawijaya, Malang. Skripsi.
- Hillis, David M. dan James J. Bull. 1993. An Empirical Test Of Bootstrapping As A Method For Assessing Confidence In Phylogenetic Analysis. *Sistem Biologi*. Vol. 42(2) : 182-192.
- Ilahude, A.G. dan Liasaputra. 1980. Sebaran normal parameter hidrologi di Teluk Jakarta. Dalam : Teluk Jakarta. Penyajian fisika, kimia, biologi dan geologi (A. Nontji, A. Djamali, eds.). LON-LIPI : 1-40.
- Irmawati. 2003. Perubahan Genetik Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Generasi Pertama pada Stok Hatchery. Bandung: IPB. Skripsi.
- Joint, Ian., Martin Mühlhling dan Joël Querellou. 2010. marine bacteria – an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial Biotechnology*. 3, 564–575.
- Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor 51 Tahun 2004 Tentang Baku Mutu Air Laut
- Krediet, C.J., Kim B. Ritchie, Valerie J. Paul, Max Teplitski. 2013. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *R. Soc. Publ.*

- Lalucat, J., Antoni Bennasar, Rafael Bosch, Elena Garc'ia-Valde's, Norberto J. Palleroni, 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 510–547.
- Lauroa FM et al. 2009. The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *PNAS*. Vol 106 ; 37: 15527-15533.
- Leboffe, Michael J. 2012. *Exercise for the Microbiology Laboratory*
- Luthfi, O.M., Putri Zulaikhah Alviana, Guntur, Sunardi, Alfian Jauhari. 2016. Distribution of Massive *Porites* at Reef Flat in Kondang Merak, Malang, Indonesia. *J. Life Sci.* 3, 23–30.
- Mien, Pham Thi . 2014. Community of soft coral *Alcyonium digitatum* associated bacteria and their antimicrobial activities. Kiel : Universität zu Kiel. Skripsi.
- Muzzazinah. 2017. Metode Filogeni Pada Indigofera. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta. Skripsi.
- Nybakken, W.J., 1988. *Biologi Laut. Suatu Pendekatan Ekologis*. Gramedia, Jakarta : 459 hal.
- Nugraha, D.A., Aida Sartimbul, Oktiyas Muzaky Luthfi. 2016. Analisis Sebaran Karang Di Perairan Kondang Merak, Malang Selatan. Seminar Nasional VI. Malang: Universitas Brawijaya.
- Novitasari, Dede Aryani., Roza Elvyra dan Dewi Indriyani Roslim. 2014. Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Total pada *Kryptopterus apogon* (Bleeker 1851) dari Sungai Kampar Kiri dan Tapung Hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau. *JOM, FMIPA.* 1, 258-261.
- Putri, Dyan Dyanmita, M.Tanzil Furqon dan Rizal Setya Perdana. 2018. Klasifikasi Penyakit Kulit Pada Manusia Menggunakan Metode Binary Decision Tree Support Vector Machine (BDTSVM). *Jurnal Pengembangan Teknologi Informasi dan Ilmu Komputer.* 2(5),1912-1920.
- Rahmaningsih, Sri., Sri Wilis dan Achmad Mulyana. 2012. Bakteri Patogen Dari Perairan Pantai Dan Kawasan Tambak Di Kecamatan Jenu Kabupaten Tuban. *Ekologia.* 12, 1-5.
- Rahmi. 2014. Prevalensi Penyakit *Karang* Di Kawasan Konservasi Laut Daerah Di Sulawesi Selatan. *Octopus* 3, 287–296.
- Ravindran, J., Chandralata Raghukumar. 2006. Pink-line syndrome, a physiological crisis in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Mar. Biol.* 149, 347–356.
- Ravindran, J., Chandralatha Raghukumar, 2006. *Histological observations on the scleractinian coral Porites lutea affected by pink-line syndrome*. *Curr. Sci.* 90.

- Rohkayati, Eni. 2009. Analisis Senyawa Antibakteri Pada Beberapa Jenis Karang Gorgonian Dan Identifikasi Berdasarkan Karakter Spikula. Yogyakarta: Universitas Negeri Sebelas Maret. Skripsi.
- Sabdon, A., Ocky Karna Radjasa. 2006. Karakterisasi Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (Black Band Disease) pada Karang *Acropora* sp. di Karimunjawa. Ilmu Kelaut. 11, 158–162.
- Sabdon, A., Paiga Hanurin Sawonua, Ary Giri Dwi Kartika, Jasmine Masyitha Amelia, Ocky Karna Radjasa. 2015. Coral Diseases in Panjang Island, Java Sea: Diversity of Anti-Pathogenic Bacterial Coral Symbionts. *Procedia Chem.* 14, 15–21.
- Salm, R.V. 1984. *Coral Reef Management Handbook*, UnescoRostrea, Jakarta, p. 15
- Samsudeen Abideen dan Manickam Babuselvam. 2014. Antagonistic activity of *Lysinibacillus fusiformis* n 139 strain isolated from marine fish *Triacanthus strigilifer* and genome sequence. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* Vol. 3(4) : 1066-1072.
- Saputri, R.A., Niniek Widyorini, Pujiono Wahyu Purnomo. 2016. Identifikasi Dan Kelimpahan Bakteri Pada Jenis Karang *Acropora* Sp. Di Reef Flat Terumbu Karang Pulau Panjang Jepara. *Fish. Sci. Technol.* 12, 35–39.
- Soltis, Pamela S. dan Douglas E. Soltis. 2003. Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statistical Science Journal.* 18, 256–267.
- Sriningsih, Atik dan Maya Shovitri. 2015. Potensi Isolat Bakteri *Pseudomonas* sebagai Pendegradasi Plastik. *Jurnal Sains Dan Seni ITS.* Vol. 4(2) : 2337-3520.
- Subagiyo, Sebastian Margino, Triyanto, Wilis Ari Setyati. 2015. Pengaruh pH, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang *Penaeid*. *Ilmu Kelaut.* 20, 187–194.
- Sudiarta, I. K. 1995. Struktur Komunitas Biota Ekosistem Terumbu Karang dan Pemintakatan Kawasan Wisata Bahari Pulau Lembongan, Bali. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. 215
- Sugiharti, Sri, Setyawan P. Sakti dan Unggul P. Juswono. 2013. Pemanfaatan *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas fluorescens* sebagai Biosensor untuk Mengukur Kadan BOD5 dalam Air. *Natural B.* Vol 2(2) : 134-139.
- Suriawira, U., 1995. *Mikrobiologi Air dan Dasar-dasar Pengelolaan Pembuangan Secara Biologis*. Bandung: Alumni.
- Susilo, Agung Wahyu. 2007. Akselerasi Program Pemuliaan Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Melalui Pemanfaatan Penanda Molekuler Dalam Proses Seleksi. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.* Vol : 23(1) : 11-24.

- Tamura, Koichiro., Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei dan Sudhir Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10):2731–2739.
- Tomova, Iva., Margarita Stoilova–Disheva dan Evgenia Vasileva–Tonkova. 1999. Characterization of heavy metals resistant heterotrophic bacteria from soils in the Windmill Islands region, Wilkes Land, East Antarctica.35, 593–607.
- Usman, W.S. 2015. Bakteri Asosiasi Karang Yang Terinfeksi Penyakit Brown Band (Brb) Di Perairan Pulau Barranglompo Kota Makassar. diterbitkan. Makasar: Universitas Hasanuddin. Skripsi.
- Wahyudi, Rifqi. 2013. Keanekaragaman Jenis Terumbu Karang Di Pantai Kondang Merak Kabupaten Malang. Malang: Universitas Islam Negeri (Uin) Maulana Malik Ibrahim . Skripsi.
- Waugh, J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bio Essays* 29, 188–197.
- Wilson, Bryan Greta S. Aeby, Thierry M. Work dan David G. Bourne. 2015. Bacterial communities associated with healthy and Acropora white syndrome-affected corals from American Samoa. Eropa: Blackwell Publishing.
- Yang, Ziheng, and Bruce Rannala. 2012. Molecular Phylogenetics: Principles and Practice. *Nature Reviews Genetics.* 13, 303–14.
- Yu, Dimitry., Sorokin, Andreas Teske, Lesley A. Robertson dan J. Gijs Kuenen. 1999. *Microbiology Ecology.* 30, 113-123.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil pengamatan dan perhitungan isolat bakteri

Keterangan Variabel:

Stn.	Pengencer-an	Ulangan		
		A	B	
		Isolat	Isolat	
1	10 ⁻³	PCRE	MCCE	
		SCRE	SIRL	
		MIRL	SIRS	
			PIRU	
	10 ⁻⁴	LIFL	MIRS	
		SIRL	PCFE	
		MIRS	LIFU	
			MCFE	
	10 ⁻⁵	LIFU	LIFU	
		MIUL	MIRU	
PCRU		SCRE		
2	10 ⁻³	PCRE	MCCE	
		SIRL	SIRL	
		MIRL	SCRE	
			SCUE	
			PCRE	
	10 ⁻⁴	MIRS	TBUD	
		SCRE		
	10 ⁻⁵	MIUU	TBUD	
		SCUE		
		PCUE		
		SFRF		
		LIRU		
	3	10 ⁻³	LIFU	TBUD
			MCCE	
PCRE				
10 ⁻⁴		SPEA-DER	SPREA-DER	
10 ⁻⁵		SPEA-DER	SPREA-DER	

: Apabila isolat

TBUD >300

: P (*Point*), S

(*Small*), M

(*Moderate*),

Ukuran atau L (*Large*)

: C (*Circular*)

atau I

Bentuk (*Irregular*)

: R (*raised*), C

(*Convex*), F

(*Flat*), atau U

Elevasi (*Umbonate*)

: E (*Entire*), L

(*Lobate*), S

(*Serate*), atau

Margin U (*Undulate*)

Lampiran 2. Tabel isolat dominan

ISOLAT	S1	S2	S3	Σ Frekuensi	Prosentase (%)
LIFU	3	0	1	4	10
PCRE	1	2	1	4	10
SCRE	2	2	0	4	10
SIRL	2	2	0	4	10
SCUE	0	2	1	3	8
MIRS	2	1	0	3	8
MCCE	1	1	1	3	8
MIRL	1	1	0	2	5
MIUL	1	0	0	1	3
PCRU	1	0	0	1	3
LIFL	1	0	0	1	3
PCUE	0	1	0	1	3
MCFE	1	0	0	1	3
SIRS	1	0	0	1	3
PIRU	1	0	0	1	3
MIRU	1	0	0	1	3
PCFE	1	0	0	1	3
SFRF	0	1	0	1	3
MIUU	0	1	0	1	3
LIRU	0	1	0	1	3
Jumlah Prosentase					100

Keterangan :

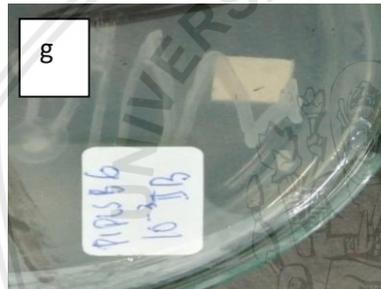
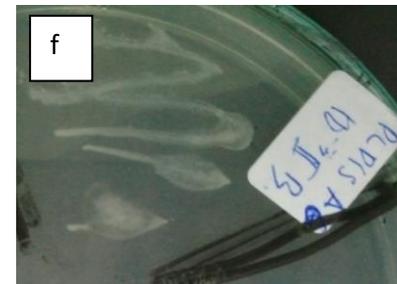
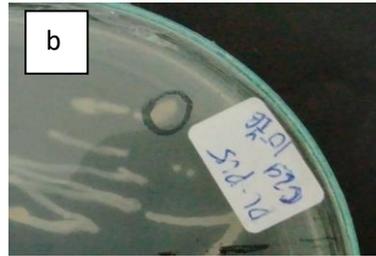
Isolat : Isolat bakteri dengan kode masing-masing

S1,2,3 : Stasiun pengambilan sampel

Σ frekuensi : Banyaknya isolat yang muncul dalam seri penanaman

Prosentase : Persen dari masing-masing isolat, yang dilakukan uji molekuler dengan prosentasi 8-10% serta dilihat dari jumlah koloni.

Lampiran 3. Hasil pemurnian metode zigzag streak plate



Keterangan :

a). LIFU

b). MIRS

c). SCUE

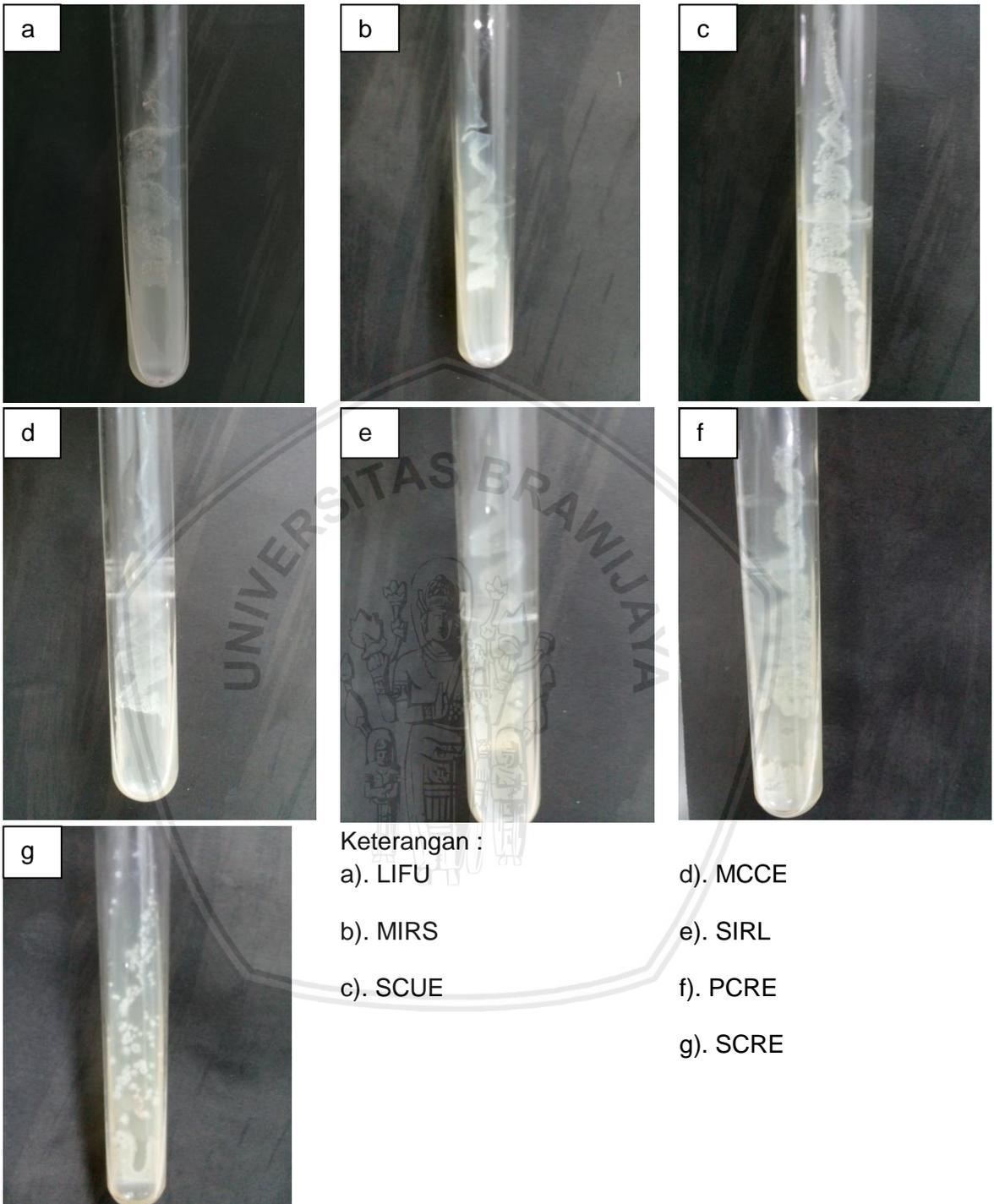
d). MCCE

e). SIRL

f). PCRE

g). SCRE

Lampiran 4. Hasil peremajaan bakteri



Keterangan :

a). LIFU

b). MIRS

c). SCUE

d). MCCE

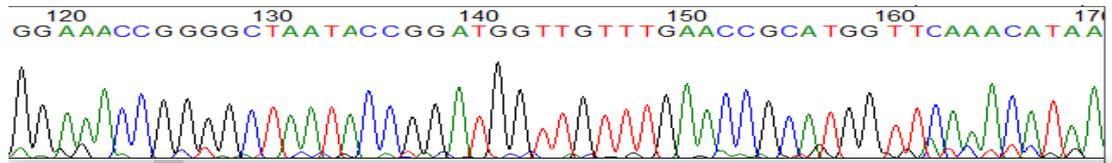
e). SIRL

f). PCRE

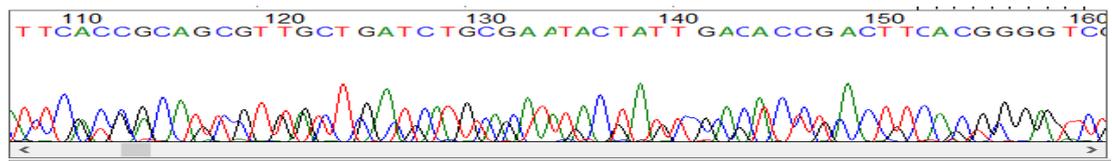
g). SCRE

Lampiran 5. Hasil elektroforegram

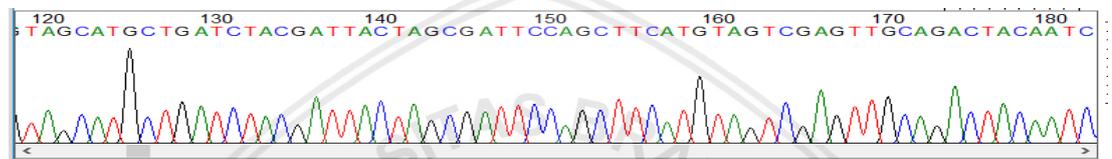
Isolat LIFU



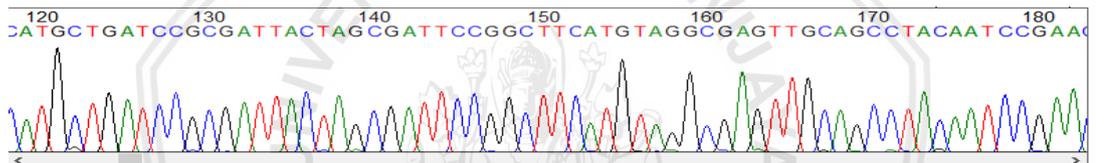
Isolat MIRS



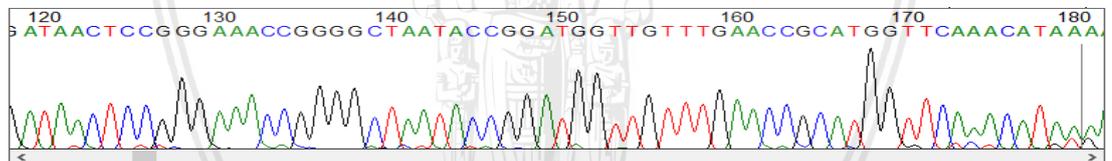
Isolat MCCE



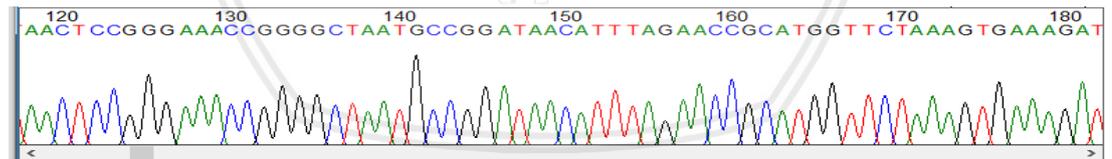
Isolat SIRL



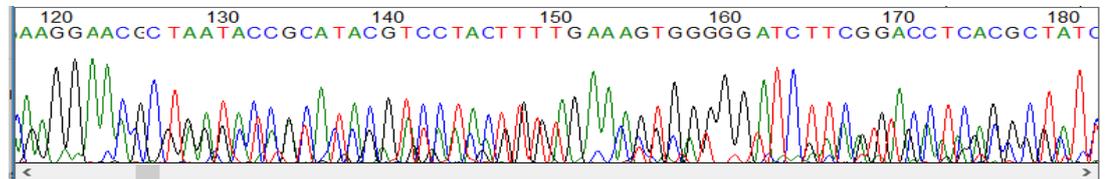
Isolat SCUE



Isolat PCRE



Isolat SCORE



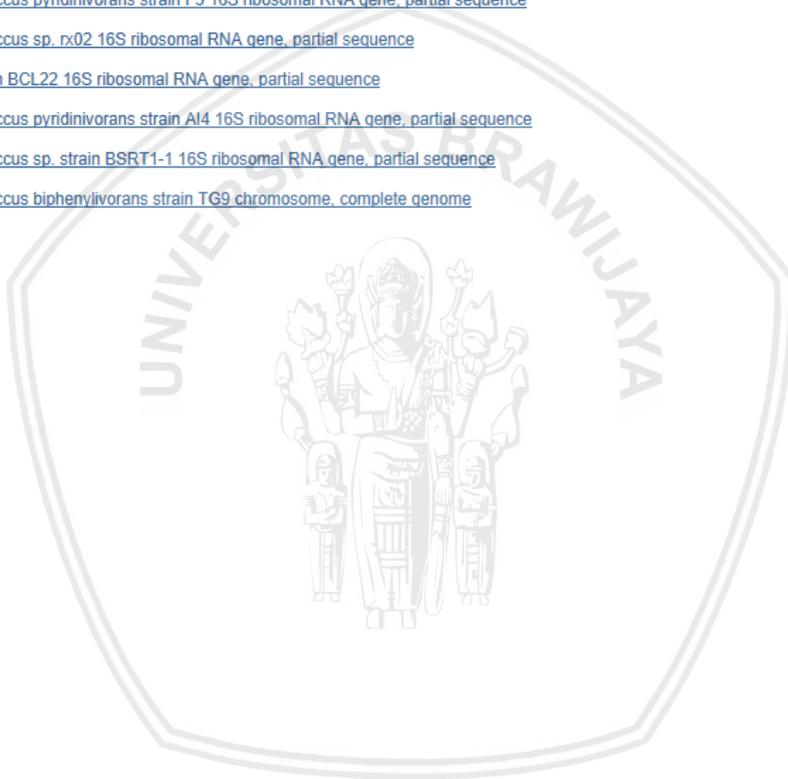
Lampiran 6. Hasil BLAST

a. Isolat LIFU

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. NCCP-1121 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2507	2507	100%	0.0	99%	qii1902761045 LC065148.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain DSS-STR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1190465238 MF076547.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain FJAT-29965 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1339876732 MG905837.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain H-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1227110454 KX702961.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain IP18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1147710286 KY621529.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain G33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1129645280 KX343992.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain D12-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii946719279 KT955740.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacterium strain CDSHGTR2A-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1064245855 KU743239.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacterium strain CDSHGTGPM-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1064245853 KU743237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain cjp-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1043113299 KU519333.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus tequilensis strain JS20H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1032812635 KX129847.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain CZ-BHG005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii1001822971 KT765841.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain CR26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii939467363 KR780430.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. CR10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii939467347 KR780414.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain KPBa 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii928195958 KR054105.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. X15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2501	2501	100%	0.0	99%	qii817380345 KP262341.1

b. Isolat MIRS

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. R1101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	915	915	86%	0.0	83%	gi 411101113 JQ775394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. BF-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	915	915	86%	0.0	83%	gi 144601480 EF494201.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. strain R-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 1382335409 MF148446.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus pyridinivorans strain NK19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 1269013988 KY703220.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus pyridinivorans strain WZ026 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 1200755987 MF193901.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. strain JT-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 1063645153 KX346234.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus pyridinivorans strain B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 971461633 KT380505.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. CH13 partial 16S rRNA gene, strain CH13	913	913	69%	0.0	87%	gi 822600271 AM711571.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacterium BCL24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	69%	0.0	87%	gi 582979801 KF964401.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus pyridinivorans strain F5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	69%	0.0	87%	gi 1205300553 KX791436.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. rx02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	86%	0.0	83%	gi 815729997 KP322594.1
<input type="checkbox"/>	Bacterium BCL22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	911	911	89%	0.0	83%	gi 582979800 KF964400.1
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus pyridinivorans strain AI4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	69%	0.0	87%	gi 1440885322 MH707179.1
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus sp. strain BSRT1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	909	909	69%	0.0	87%	gi 1434687109 MH105079.1
<input type="checkbox"/>	Rhodococcus biphenylivorans strain TG9 chromosome, complete genome	909	3638	69%	0.0	87%	gi 1418395679 CP022208.1



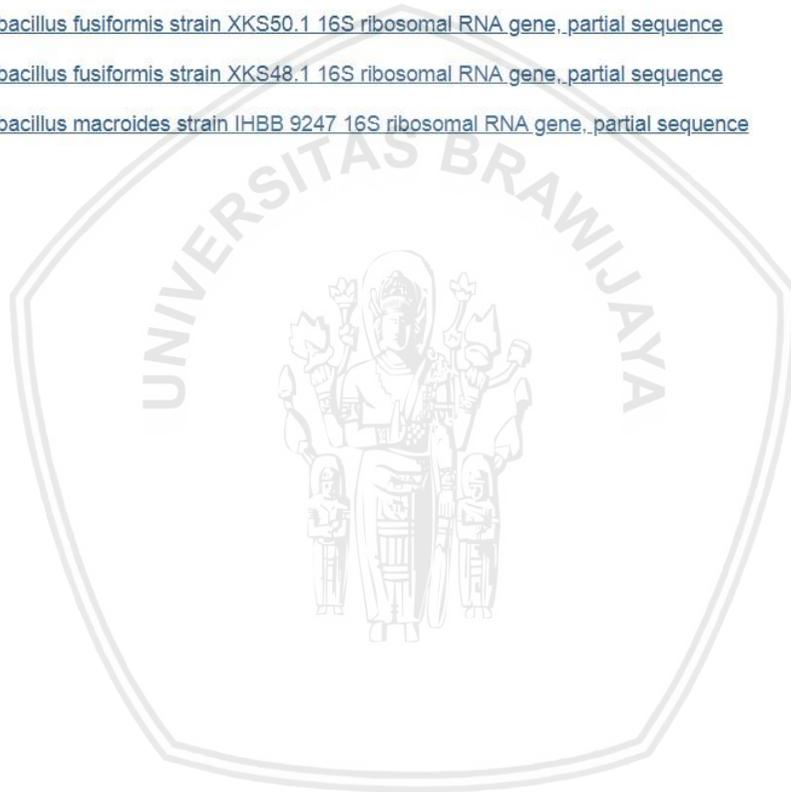
c. Isolat MCCE

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain MP-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	MH012169.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain 5H7a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	KJ512889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain 3H1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	KJ512888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. S21914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	KF956685.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. HL-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	JF734321.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain R1-7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	HQ154557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain CM18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	EU660331.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain ATCC 43957 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2526	2526	100%	0.0	100%	NR_024664.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2524	2524	99%	0.0	100%	KR047785.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. DLB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2524	2524	99%	0.0	100%	KF791525.1



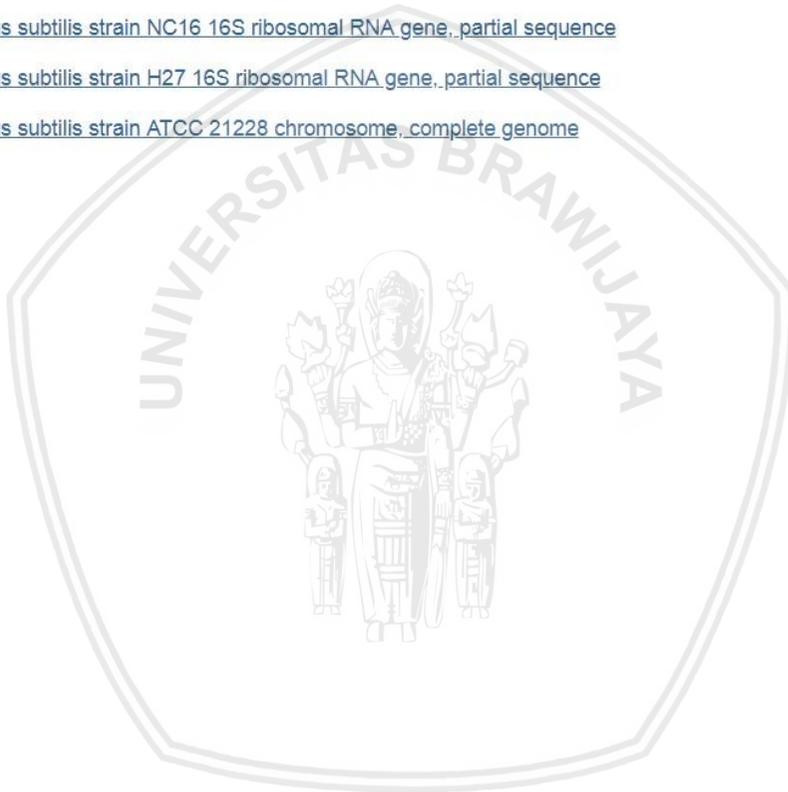
d. Isolat SIRL

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
✓	Lysinibacillus macroides strain XZMYA-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	MF170826.1
✓	Lysinibacillus macroides strain Xi9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KY317957.1
✓	Lysinibacillus macroides strain C7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KX832686.1
✓	Lysinibacillus xylanilyticus strain C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KX832684.1
✓	Lysinibacillus sp. strain GZUIFR-YC02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KU950359.1
✓	Lysinibacillus macroides strain CS26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KR780381.1
✓	Lysinibacillus macroides strain SPL1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KT818804.1
✓	Lysinibacillus fusiformis strain XKS50.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KP872952.1
✓	Lysinibacillus fusiformis strain XKS48.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KP872951.1
✓	Lysinibacillus macroides strain IHBB 9247 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2538	2538	100%	0.0	99%	KR085803.1



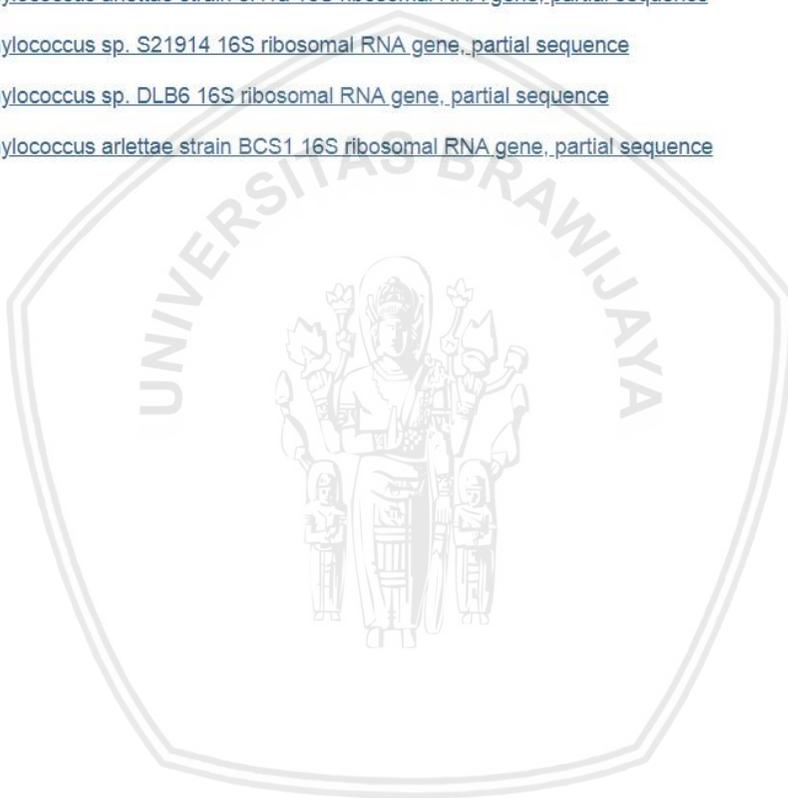
e. Isolat SCUE

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis subsp. subtilis strain OOM13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MH542292.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacterium strain JAKS27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MF664538.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus sp. (in: Bacteria) strain ZCHW3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MH411163.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain DSS-STR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MF076547.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain P0070Karwar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MG782866.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis strain GQJK60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MH244326.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis strain 52-LR1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MF077125.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain NC16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MH100679.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain H27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2397	2397	100%	0.0	100%	MH045978.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain ATCC 21228 chromosome, complete genome	2397	23889	100%	0.0	100%	CP020023.1



f. Isolat PCRE

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain MP-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	MH012169.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. NIMD13 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	LC189167.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain DRLM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KU550159.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KR047785.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain NS2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KP279979.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain 5H7a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KJ512889.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain 3H1a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KJ512888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. S21914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KF956685.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus sp. DLB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KF791525.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Staphylococcus arlettae strain BCS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2471	2471	100%	0.0	100%	KF224916.1



g. Isolat
SCORE

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain W28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1964	1964	97%	0.0	92%	gil971461701 KT380573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain XH03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1960	1960	97%	0.0	92%	gil1129881036 KX585258.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain W15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1958	1958	97%	0.0	92%	gil971461689 KT380561.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain RC11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1958	1958	96%	0.0	92%	gil625295180 KJ499802.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacterium strain GZ16111700525(BJ-1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	97%	0.0	92%	gil1339307664 KY963532.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain W32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	96%	0.0	92%	gil971461705 KT380577.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain W31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	96%	0.0	92%	gil971461704 KT380576.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain W43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	96%	0.0	92%	gil971461678 KT380550.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain B41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1956	1956	96%	0.0	92%	gil971461669 KT380541.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. JS-C54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1954	1954	96%	0.0	92%	gil675823658 KJ921735.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. 2(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1954	1954	96%	0.0	92%	gil530398421 KF171339.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. BC045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1954	1954	97%	0.0	92%	gil304650874 HQ105013.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. strain W6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1953	1953	96%	0.0	92%	gil1451816819 MH773162.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas stutzeri strain KMS55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1953	1953	96%	0.0	92%	gil1119205452 KY355732.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain Xmb041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1953	1953	96%	0.0	92%	gil1036124250 KT986169.1



