

**ISOLASI DNA BAKTERI TANPA KULTIVASI DARI SEDIMEN
DI PULAU BANGKA SULAWESI UTARA**

SKRIPSI

OLEH:

**MEIVYARNI WANGKA
16051103043**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
MANADO
2020**

**ISOLASI DNA BAKTERI TANPA KULTIVASI DARI SEDIMEN
DI PULAU BANGKA SULAWESI UTARA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Sam Ratulangi

Oleh:

**MEIVYARNI WANGKA
NIM. 16051103043**

**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS SAM RATULANGI
MANADO
2020**

LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Meivyarni Wangka

NIM : 16051103043

Menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, kecuali bagian yang sumber informasi dicantumkan.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Manado, Juni 2020

Meivyarni Wangka

LEMBAR PENGESAHAN

Yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa:

Nama : Meivyarni Wangka

NIM : 16051103043

Judul Penelitian : **Isolasi DNA Bakteri Tanpa Kultivasi dari Sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara**

Tanggal Ujian : 14 Juli 2020

Lulus ujian Skripsi, dan telah diperiksa, diperbaiki, dan disetujui oleh dosen pembimbing.

**Menyetujui:
Dosen Pembimbing,**

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Elvy Like Ginting M.Si, M.Sc.
NIP. 19680111 199103 2 001

Stenly Wullur, S.Pi, M.Sc, Ph.D.
NIP. 19740302 200112 1 003

Mengetahui:

**Wakil Dekan
Bidang Akademik**

**Koordinator Program Studi Ilmu
Kelautan**

Dr. Ir. Johnny Budiman, M.Si, M.Sc
NIP. 19670519 199403 1 002

Ir. Medy Ompi, M.Sc, Ph.D.
NIP.19640523 198903 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dipanjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, karena begitu besar penyertaan, bimbingan serta pertolonganNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi dengan judul “ISOLASI DNA BAKTERI TANPA KULTIVASI DARI SEDIMEN DI PULAU BANGKA SULAWESI UTARA”.

Skripsi Isolasi DNA Bakteri Tanpa Kultivasi ialah untuk memperoleh DNA genom yang berasal dari Sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara menggunakan prosedur *Kit*. Harapan penulis semoga Skripsi ini dapat bermanfaat dalam pembangunan serta pengembangan ilmu pengetahuan dalam bidang perikanan dan kelautan. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan akademik dalam proses menyelesaikan studi Strata di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado.

Manado, Juni 2020

Penulis

UCAPAN TERIMKASIH

Selama proses penyusunan Skripsi ini, begitu banyak bantuan tulus dari berbagai pihak yang diterima oleh penulis sehingga lewat kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Elvy Like Ginting, M.Si.M.Sc. dan Stenly Wullur, S.Pi, M.Sc, Ph.D sebagai Dosen pembimbing, yang telah menyediakan waktu dan pikiran serta dengan sabar membimbing dan mengarahkan penulis dalam penyusunan Skripsi.
2. Esther Dellayani Angkouw, S.Pi, M.Si; Ir. Jane M. Mamuaja, M.Sc Ph.D dan Dr. Ir. Reiny A. Tumbol, M.App.Sc sebagai tim penguji yang telah memberikan saran, kritik dan arahan yang membangun dalam penyusunan Skripsi.
3. Dr. Ir. Medy Ompi, M.Sc. Sebagai koordinator Program Studi Ilmu Kelautan untuk motivasi dan arahan yang diberikan selama berkuliah dan proses penyelesaian study.
4. Prof. Ir. Farnis B. Boneka, M.Sc selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi, Dr. Ir. Johnny Budiman, M.Si, M.Sc selaku Wakil Dekan I, Dr. Ir. Unstain N. W. J. Rembet, M.Si selaku Wakil Dekan II, dan Ir. Engel Viktor Pandey, M.Phil selaku Wakil Dekan III.
5. Seluruh staf dosen pengejar dan pegawai Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
6. Keluarga Tercinta. yang telah memberi motivator, semangat, cinta kasih dan doa bagi penulis.
7. Feren C. Paka sebagai sahabat, yang selalu menjadi pendengar setia dan motivator sampai sekarang.
8. Kakak Stanly yang selalu jadi motivator dan penyemangat bagi penulis

9. Kaka Louis Letha S.Kel., M.Si yang telah memberi waktu, tenaga dan pikiran dalam membantu penulis pada saat proses penelitian sampai penyusunan Skripsi.
10. Tim Penelitian Laboratorium Biologi Molekuler: Dhebbby Purba S.Kel., Oktavianus Dalenoh S.Kel., Asriel Karuti S.Kel. yang telah setia menemani penulis baik susah maupun duka.
11. Teman-teman Nudibranch16 sebagai teman-teman seperjuangan dikelas yang selalu membantu memberi motivasi dan arahan selama ini.
12. Kakak-kaka S2 di FPIK UNSRAT yang telah memberi semangat dalam penyusunan Skripsi ini.
13. Serta semua pihak yang telah mendoakan, memotivasi, mendukung, memberi masukan dan membantu moral maupun material yang tidak sempat disebutkan satu-persatu.

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK

Sebagai sivitas akademik Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Unsrat, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Meivyarni Wangka

NIM : 1605110343

Jurusan/Program Studi : Manajemen Sumberdaya Perikanan/Ilmu Kelautan

Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan **Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif**, atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Isolasi DNA Bakteri Tanpa Kultivasi dari Sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara.

Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*data base*), mendistribusikan dan mempublikasikan tugas akhir saya, tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai Hak Cipta.

Demikianlah Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Manado

Pada tanggal : 27 Juli 2020

Yang menyatakan,

(Meivyarni Wangka)

RINGKASAN

Meivyarni Wangka. Isolasi DNA Bakteri Tanpa Kultivasi dari Sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara. Dibimbing oleh Ir. Elvi Like Ginting M.Sc., Ph.D. dan Stenly Wullur, S.Pi., M.Sc., Ph.D.

Pulau Bangka merupakan salah satu dari beberapa pulau-pulau kecil yang berada di Sulawesi Utara, memiliki sedimen yang umumnya terdiri dari partikel gampingan yang berwarna kecokelataan dan ukuran bervariasi dari butiran halus hingga kasar. Sedimen memiliki populasi mikroorganisme salah satunya bakteri.

Penelitian ini merupakan tahapan awal dalam rangkaian analisis molekuler dari sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan DNA genom bakteri yang tanpa melalui proses kultivasi. Isolasi DNA genom bakteri tanpa kultivasi ini dilakukan dengan mengikuti prosedur ekstraksi *Kit* DNA genom. DNeasy® *PowerSoil Kit* Handbook dengan modifikasi prosedur berupa: adanya proses atau tanpa adanya proses *freezing and thawing* pada tahap awal isolasi DNA genom. Hasil isolasi DNA selanjutnya diuji kualitatif menggunakan elektroforesis dan uji kuantitatif menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. DNA genom hasil isolasi selanjutnya di kirim ke Genetica Science, Jakarta untuk di amplifikasi.

DNA berhasil diisolasi menggunakan Prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* dengan perlakuan proses *freezing and thawing*. Pita DNA amplifikasi terdeteksi pada posisi panjang basa berkisar antara 1300-1600bp. Hasil spektrofotometer diperoleh kemurnian DNA dibawah 1,8 yang berarti DNA genom tersebut belum dikatakan murni. DNA dikatakan murni apabila berkisar 1,8-2,0.

Kata kunci: Sedimen, Isolasi, DNA, *PowerSoil*, *Kit*

DAFTAR ISI

	<i>Halaman</i>
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
UCAPAN TERIMKASIH	vi
RINGKASAN	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Sedimen	4
2.2. Bakteri Laut	5
2.3. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA)	6
2.4. Isolasi DNA	8
2.5. Elektroforesis Gel	9
2.6. Spektrofotometer	10
3. METODE PENELITIAN	12
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2. Pengambilan Sampel	13
3.3. Bahan dan Alat	13
3.4. Prosedur Penelitian	13
3.4.1. Isolasi DNA Bakteri Pada Sedimen laut	14
3.4.1.1. Prosedur <i>PowerSoil Kit</i> Tanpa Perlakuan Awal terhadap sampel	14
3.4.1.2. Prosedur <i>PowerSoil Kit</i> dengan Perlakuan Awal terhadap sampel	15
3.4.1.3. Ekstraksi DNA Bakteri Kontrol Positif	16
3.4.2. Elektroforesis Gel	17
3.4.3. Spektrofotometer	18
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1. Sampel Sedimen laut	20
4.2. Hasil Uji Kualitatif DNA	20

4.2.1. Isolasi DNA Prosedur <i>PowerSoil Kit</i> Tanpa Perlakuan Awal Terhadap Sampel	20
4.2.2. Isolasi DNA Prosedur <i>PowerSoil Kit</i> dengan Perlakuan Awal Terhadap Sampel	21
4.3. Hasil Uji Kuantitatif DNA	22
5. KESIMPULAN DAN SARAN	27
5.1. Kesimpulan	27
5.2. Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	33

DAFTAR TABEL

<i>Tabel</i>	<i>Halaman</i>
1. Kode Sampel Sedimen	20
2. Parameter lingkungan titik pengambilan sampel sedimen	20
3. Hasil uji kemurnian DNA Bakteri sedimen SedE1, SedE2 Prosedur PowerSoi Kit tanpa perlakuan awal	22
4. Hasil uji kemurnian DNA Bakteri sedimen SedE1, SedE2, SedBt setelah melewati <i>freezing and thawing</i>	23

DAFTAR GAMBAR

<i>Gambar</i>	<i>Halaman</i>
1. Struktur Untai Ganda DNA	7
2. Basa Purin dan Pirimidin	7
3. Solis Biodyne 100bp <i>Ladder</i>	9
4. Kerja Spektrofotometer UV-VIS	10
5. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Pulau Bangka, Sulawesi Utara pada zona Litoral dan zona Bentik	12
6. Hasil elektroforesis DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2. Prosedur DNeasy® PowerSoil Kit tanpa perlakuan awal	21
7. Hasil elektroforesis DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2, SedBt3 melewati proses <i>freezing and thawing</i>	21
8. Hasil amplifikasi DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2, SedBt3	24
9. Hasil elektroforesis DNA bakteri kontrol positif	24

DAFTAR LAMPIRAN

<i>Lampiran</i>	<i>Halaman</i>
1. Pengambilan Sampel sedimen	33
2. Sampel sedimen	33
3. Alat dan Bahan	34
4. Bagan Alir Pengekstraksian DNA	37
5. Dokumentasi Tahapan Penelitian	38
6. Bagan Alir Elektroforesis Gel	39

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pulau Bangka merupakan salah satu dari beberapa pulau-pulau kecil yang berada di Sulawesi Utara memiliki sedimen yang umumnya terdiri dari partikel gampingan yang berwarna kecokelataan dan ukuran bervariasi dari butiran halus hingga kasar (Dewi *dkk.*, 2017). Sedimen laut merupakan suatu habitat yang kaya akan nutrient dan berperan penting dalam siklus karbon, selain itu juga mengandung berbagai macam unsur bahan organik yang tinggi dan kompleks dengan kandungan mencapai 0,5-20% berat kering dari sedimen.

Sedimen laut umumnya memiliki potensi kandungan organik yang tinggi berada pada daerah tropis di wilayah Indonesia (Riyanto, 2011). Sedimen memiliki populasi mikroorganisme yang melimpah (Bissett *dkk.*, 2007). Mikroorganisme yang terdiri dari organisme hidup yang berukuran sangat mikroskopis yakni: bakteri, protozoa, virus, alga dan jamur mikroskopis (Pelezar dan Chan, 2007 *dalam* Irianto, 2016). Salah satu mikroorganisme ini adalah bakteri yang banyak dikenal baik berdampak negatif maupun positif pada manusia, hewan dan tumbuh-tumbuhan (Pelezer dan Chan, 2005 *dalam* Irianto, 2016).

Bakteri menjadikan sedimen laut sebagai habitat atau tempat tinggalnya. Saat ini dalam menganalisis suatu bakteri secara molekuler dibutuhkan DNA genom bakteri untuk mengkaji lebih jauh tentang keberadaan dan regulasi gen tersebut

(Pambudiono *dkk.*, 2016). Dalam analisis molekuler yang harus dipenuhi yaitu mendapatkan hasil DNA berkualitas tinggi (Restu *dkk.*, 2012).

Isolasi DNA adalah sebuah teknik dalam biologi molekuler yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari semua komponen penyusun sel (Wilson dan Walker, 2010). Teknik isolasi DNA telah dikembangkan dari prinsip dasar sehingga saat ini muncul berbagai teknik isolasi DNA dalam bentuk *Kit* yang prosesnya lebih mudah, cepat dan sederhana. Isolasi DNA pada bakteri saat ini umumnya digunakan dengan cara kultur bakteri misalnya pada beberapa penelitian seperti: identifikasi bakteri pada media kultur rotifer (Napitupulu *dkk.*, 2019), bakteri simbiosis spons (Rangian *dkk.*, 2018) dan bakteri asosiasi pada alga (Wantania *dkk.*, 2019). Untuk penelitian isolasi DNA terhadap bakteri tanpa kultivasi masih kurang dilaksanakan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen laut di Pulau Bangka, Sulawesi Utara. DNA bakteri tanpa kultivasi selanjutnya dapat digunakan untuk analisis komunitas bakteri pada sedimen di daerah tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen dapat diisolasi?
2. Apakah DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen dapat dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen
2. Mengetahui kualitatif dan kuantitatif DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sedimen

Sedimen menurut Ponce (1989) *dalam* Hambali dan Apriyanti (2016) merupakan suatu produk disintegrasi dan dekomposisi pada batuan. Disintegrasi mencakup seluruh proses rusak atau pecahnya batuan, tanpa perubahan substansi kimiawi yang dapat menghasilkan suatu butiran-butiran kecil. Dekomposisi mengacu pada pemecahan komponen mineral batuan oleh reaksi kimia. Dekomposisi mencakup proses karbonasi, hidrasi, oksidasi dan solusi. Karakteristik butiran mineral dapat menggambarkan properti sedimen, antara lain ukuran (size), bentuk (shape), berat volume (specific weight), berat jenis (specific gravity) dan kecepatan jatuh/endap (fall velocity).

Sedimen di laut terdiri dari 5 sampai 10 milyar ton partikel bahan organik yang terakumulasi (Jorgense, 1983 *dalam* Sukiman, 2017). Sedimen laut menutupi 70% permukaan bumi dan berperan penting dalam siklus karbon dan nutrien bagi kehidupan biota laut (Rochelle *dkk.*, 1994 *dalam* Sukiman, 2017). Menurut Hedges dan Oades (1997) permukaan sedimen laut pada umumnya mengandung akumulasi bahan organik sebesar 0,1-10 %, sedangkan Reimers *dkk.*, (2001) melaporkan bahwa sedimen dasar benua (<1000 m) memiliki kandungan karbon organik sebesar 2-3% (bobot kering). Berdasarkan laporan Emerson dan Hedges (2008) *dalam* Umami (2019) menunjukkan bahwa kecepatan sedimentasi bahan organik sangat dipengaruhi oleh kandungan dalam bahan organik itu sendiri. Bahan organik yang mengandung

mineral akan lebih cepat tersedimentasi dibandingkan bahan organik yang tidak mengandung mineral.

Komposisi sedimen pantai dan dasar laut dipengaruhi oleh berbagai hal, baik kondisi geologi, morfologi, iklim maupun proses yang bekerja. Proses yang paling berpengaruh terhadap sedimentasi di daerah pantai dan perairan dangkal adalah pasokan sedimen dari sungai, gelombang, pasang-surut, arus sejajar pantai, arus tegak lurus pantai dan sebagainya. Secara umum komposisi sedimen pantai dan perairan dangkal di daerah subtropis dan pulau gunung api didominasi oleh kuarsa, feldspar dan mineral berat sedangkan di daerah tropis didominasi oleh cangkang dan fragmen cangkang dan juga oolit (Komar, 1998 *dalam* Zuraida *dkk.*, 2018). Distribusi ukuran butir dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis agen transportasi, gelombang, pasang surut, angin lokal dan badai episodik yang masing-masing memiliki karakteristik spasial dan temporal sendiri (Liu *dkk.*, 2000). Faktor oseanografi yang berperan dalam distribusi sedimen di suatu perairan adalah arus, khususnya terhadap sedimen tersuspensi (*suspended sediment*) (Purnawan *dkk.*, 2012). Sedimen juga dijadikan sebagai habitat bagi beberapa organisme laut baik yang berukuran makro maupun mikro salah satunya yaitu bakteri.

2.2 Bakteri Laut

Bakteri adalah mikroorganisme bersel tunggal yang kasat mata, berukuran antara 0,5 – 10 μm dan lebar 0,5 – 2,5 μm tergantung pada jenisnya (Pakpahan, 2009). Bakteri terdapat secara luas di alam, di dalam tanah, di atmosfer, di dalam lumpur, air laut maupun dalam tubuh hewan, manusia dan tanaman. Jumlah bakteri

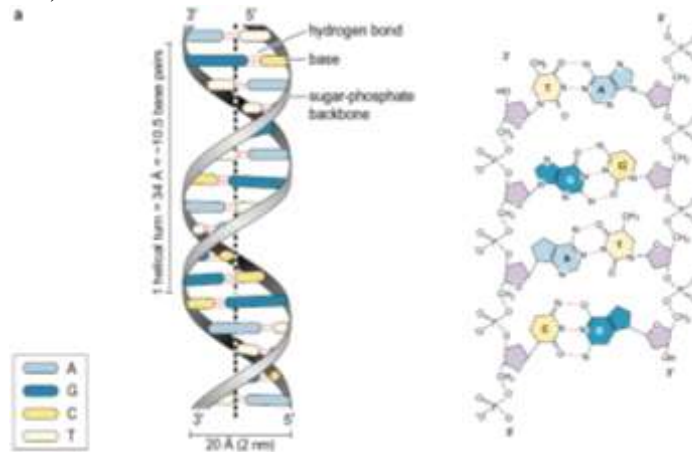
tergantung keadaan sekitar (Pratita dan Putra, 2012). Bakteri memiliki sel yang terdiri dari membran dan sitoplasma, sel dibungkus oleh dinding sel. Pada beberapa jenis bakteri dinding sel dikelilingi oleh kapsul atau lapisan lendir. Kapsul berisi campuran polisakarida dan polipeptida. Bakteri bereproduksi dengan cara pembelahan biner yaitu salah satu reproduksi aseksual dengan cara memisahkan tubuh menjadi dua bagian. Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, O₂, CO₂, pH, nutrient dan cahaya. Bakteri memiliki flagella yang tumbuh dalam membran sel berupa struktur yang menyerupai benang panjang, berbentuk seperti cambuk. Flagella ini merupakan alat gerak bakteri yang bergerak dengan cara mendorong bakteri dalam cairan (Leboffe *dkk.*, 2012).

Sedimen laut memiliki kandungan nutrien yang tinggi, sehingga dijadikan sebagai habitat yang sangat mendukung pertumbuhan bakteri (Atlas dan Bartha, 1993). Spesies bakteri sedimen laut umumnya gram positif pada genus *Bacillus*, *Actinomyces* dan bakteri gram negatif terutama *Pseudomonas* spp, *Alteromonas* sp (Pandey *dkk.*, 2002). Aktivitas bakteri dalam siklus unsur hara pada sedimen adalah suatu hal yang tidak bisa dipisahkan. Aktivitas bakteri tersebut tergantung pada ketersediaan karbon-karbon yang dioksidasi (Pollard *dkk.*, 1993).

2.3 Deoxyribonucleic Acid (DNA)

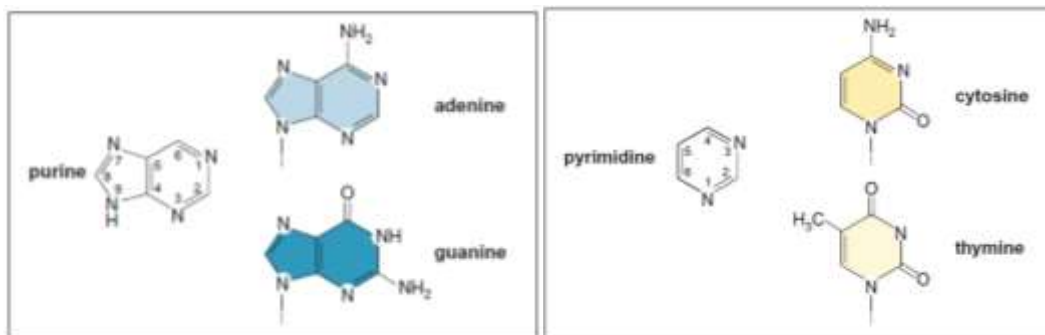
DNA terdiri dari struktur kimia yang berulang dimana terdapat gugus fosfat yang terkait dengan gula deoksiribosa untuk membentuk struktur dasar dari molekul ini. Pada setiap gugus gula, terdapat tambahan gugus kimia yang dikenal dengan basa nitrogen yang memiliki 4 tipe yaitu adenin (A), timin (T), guanin (G) dan

sitosin (C). kombinasi dari fosfat, gula dan basa nitrogen disebut dengan nukleotida. Sebuah kromosom dapat mengandung lebih dari 100 juta nukleotida dan dapat dijelaskan oleh urutan rantai tunggal DNA (Brenner dan Miller, 2001 *dalam* Annisaqois, 2018).



Gambar 1. Struktur Untai Ganda DNA (Campbell, 2008 *dalam* Annisaqois, 2018)

Basa di DNA dibagi menjadi 2 yaitu purin dan pirimidin. Purin dibagi menjadi adenine dan guanin dan pirimidin dibagi menjadi sitosin dan timin. Purin berasal dari struktur dua cincin yang dapat dilihat dari gambar 3. Adenin dan guanin terbagi dengan struktur esensial dua cincin, tidak seperti sitosin dan timin yang dibedakan dengan satu cincin. Gambar 3 juga menunjukkan posisi penomoran dari cincin purin dan pirimidin (Passarge, 2007).



Gambar 2. Basa Purin dan Pirimidin (Passarge, 2007).

2.4 Isolasi DNA

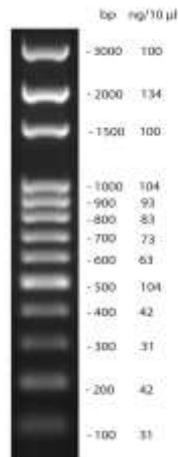
DNA dapat diisolasi baik dari sel hewan, manusia, maupun pada tumbuhan. Isolasi DNA merupakan langkah awal dalam melakukan identifikasi molekuler suatu organisme. Isolasi DNA adalah sebuah teknik dalam biologi molekuler yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari semua komponen penyusun sel lainnya seperti karbohidrat, protein, lemak, air, RNA dan ion anorganik lainnya. Prinsip dasar isolasi total DNA dari jaringan adalah dengan memecah dan mengekstraksi jaringan tersebut sehingga akan terbentuk ekstrak sel yang terdiri atas sel jaringan DNA. Kemudian ekstrak sel dipurifikasi sehingga dihasilkan debris sel yang mengandung DNA total (Wilson dan Walker, 2010).

Ekstraksi DNA meliputi beberapa tahapan proses penting yaitu, dari mulai tahap persiapan hingga akhirnya diperoleh ekstrak DNA yang terlarut dalam suatu larutan penyangga (*buffer*) khusus. Larutan tersebut digunakan untuk menyimpan dan mempertahankan kondisi DNA secara kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif lama. Secara kualitatif, berarti larutan penyangga tersebut harus dapat mempertahankan kualitas DNA yang terlarut tetap dalam kondisi baik. Sedangkan secara kuantitatif berarti larutan penyangga tersebut harus mampu mempertahankan jumlah DNA yang terlarut, sehingga jumlahnya tetap (tidak terdegradasi/rusak) dan cukup untuk digunakan dalam tahapan selanjutnya tanpa mengalami penurunan kualitas maupun kuantitas DNA terlarut. proses ekstraksi DNA, dimulai dari persiapan sampel, pemilihan metode ekstraksi yang tepat, hingga didapatkan ekstrak DNA. Keberhasilan proses ekstraksi DNA dapat diukur melalui beberapa proses

diantaranya, adalah melalui pengecekan keberadaan *band* DNA dengan metode elektroforesis atau melalui pengukuran konsentrasi DNA terlarut dengan metode spektrofotometer (Phillips *dkk.*, 2012).

2.5 Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel adalah metode standar untuk memisahkan, mengidentifikasi, mengkarakterisasi dan purifikasi dari molekul DNA. Prinsip kerja elektroforesis gel dimulai saat larutan DNA yang bermuatan listrik negatif ditempatkan pada medium berisi tenaga listrik. Molekul-molekul tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif berdasarkan muatan yang terkandung dalamnya (Magdeldin, 2012). Perpindahan molekul DNA dapat diukur menggunakan ladder yang dapat dilihat pada Gambar 3.

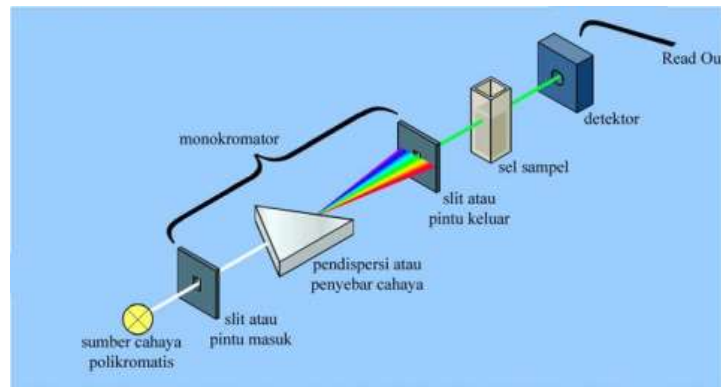


Gambar 3. Solis Biodyne 100bp *Ladder* (sumber: www.sbd.ee)

Keberhasilan pemisahan DNA dapat dilihat secara visual berdasarkan jumlah pasang basanya. Hal ini dilakukan dengan cara meletakkan gel agarose di atas sinar ultraviolet untuk melihat pita-pita DNA (*bands*) dengan menggunakan alat yang disebut *UV-transilluminator* (Wilson dan Walker, 2010).

2.6 Spektrofotometer

Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektroskopi UV-Vis biasanya digunakan untuk molekul dan ion anorganik atau kompleks di dalam larutan. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spektrum ini. Tetapi spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).



Gambar 4. Kerja Spektrofotometer UV-VIS (Wacono, 2013)

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu apabila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi dipancarkan. Aplikasi rumus tersebut dalam pengukuran kuantitatif dilaksanakan dengan cara komparatif menggunakan kurva kalibrasi dari hubungan konsentrasi deret larutan alat untuk analisis suatu unsur yang

berkadar rendah baik secara kuantitatif maupun secara kualitatif, pada penentuan secara kualitatif berdasarkan puncak-puncak yang dihasilkan spektrum dari suatu unsur tertentu pada panjang gelombang tertentu, sedangkan penentuan secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang dihasilkan dari spektrum dengan adanya senyawa pengompleks sesuai unsur yang dianalisisnya (Yanlinastuti, 2016).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Sedimen laut yang dijadikan sebagai objek penelitian diambil dari perairan Pulau Bangka, Sulawesi Utara pada dua zona berbeda yaitu zona litoral (pada dua titik) dan zona bentik. Titik koordinat zona litoral, yakni titik pertama $1^{\circ}45.405'N, 125^{\circ}8.048'E$, titik kedua $1^{\circ}45.401'N, 125^{\circ}8.056'E$ dan zona bentik dengan titik koordinat $1^{\circ}44'41.32''N, 125^{\circ}9'10.45''E$ (Gambar 5). Sampel kemudian dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi untuk dilanjutkan tahap isolasi DNA, dilaksanakan pada bulan Agustus 2019 – Februari 2020. DNA yang berhasil diisolasi, selanjutnya dikirim ke PT Genetika Science, Jakarta pada bulan Maret 2020 untuk diamplifikasi, menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR).



Gambar 5. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Pulau Bangka, Sulawesi Utara pada Zona Litoral dan Zona Bantik

3.2 Pengambilan sampel

Sampel sedimen diambil pada zona litoral dan zona bentik. Zona litoral berada pada daerah mangrove dengan dua titik berbeda, sampel diambil pada kedalaman \pm 30 cm menggunakan bantuan sekop. Kemudian sampel sedimen diambil dan dimasukkan pada *tube centrifuge* 15 ml (Lampiran 1) dan sampel pada zona bentik diambil pada kedalaman 31 m dengan menggunakan alat scuba, kemudian sampel dimasukkan dalam plastik sampel dan diletakkan dalam pendingin *Dry Ice*. Sampel selanjutnya dibawa ke laboratorium Biologi Molekuler FPIK UNSRAT untuk dianalisis lebih lanjut.

Pada saat pengambilan sampel, parameter lingkungan titik pengambilan sampel diukur dengan menggunakan alat pengukur parameter *Water Quality Cheker Horiba*. Adapun parameter lingkungan yang diukur adalah suhu, salinitas, pH dan kandungan oksigen.

3.3 Bahan dan Alat

Penelitian ini dibutuhkan bahan dan alat untuk menunjang agar penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Bahan dan alat serta penggunaannya masing-masing pada saat penelitian dapat dilihat pada lampiran 3.

3.4 Prosedur Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peralatan yang dipakai seperti tabung *ependorf*, *microtip* dan spatula disterilkan terlebih dahulu menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama \pm 1 jam.

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah isolasi, elektroforesis, spektrofotometer seperti dilihat pada lampiran 5.

3.4.1 Isolasi DNA Bakteri Pada Sedimen Laut

Pada penelitian ini, isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen laut menggunakan dua metode ekstraksi. Hal ini bertujuan untuk mencoba tahapan yang paling sesuai untuk mendapatkan DNA yang berkualitas baik. Adapun metode tersebut adalah sebagai berikut:

3.4.1.1 Prosedur *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal terhadap sampel

Isolasi DNA bakteri dari sedimen tanpa kultivasi pada metode menggunakan prosedur *Kit* ekstraksi DNA DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018). Pertama-tama *PowerBead Pro Tube* disentrifugasi terlebih dahulu dengan kecepatan 6000 rpm selama 2 menit, untuk memastikan manik-manik telah mengendap di bagian bawah. Sampel sedimen sebanyak 0,25 gr dan CD1 800 µl ditambahkan dan selanjutnya divortex agar semua tercampur sempurna. *PowerBead Pro Tube* ditelatakan secara horizontal pada Adaptor Vortex selama 10 menit. Kemudian disentrifugasi *PowerBead Pro Tube* dengan kecepatan 15.000 x g selama 1 menit pada suhu kamar (15.000 x g = 12.791 rpm). Sebanyak 600 µl supernatan dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 2 ml yang bersih. Kemudian ditambahkan 200 µl larutan CD2 dan divortex selama 5 detik selanjutnya disentrifugasi kembali pada kecepatan 15.000 x g. Supernatan 700 µl dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* 2 ml yang bersih selanjutnya ditambahkan 600 µl larutan CD3 dan divortex selama 5 detik. Setelah itu, lisat 650 µl dipindahkan ke *tube* saringan (*MB Spin Column*) dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Kemudian supernatan (*flow-through*) dibuang dan “ulangi langkah sebelumnya” sehingga semua lisat telah tersaring (menggunakan

MB Spin Column). Debris (*MB Spin Column*) ditempatkan dengan hati-hati ke dalam *tube (tube collection)* 2 ml yang bersih (tersedia). “Hindari kontaminasi dalam setiap langkah penelitian ini”.

Larutan EA sebanyak 500 µl ditambahkan ke *MB Spin Column* yang mengandung debris selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 15.000 x g selama 1 menit. Hasil saringan (*flow-through*) dibuang dan debris (*MB Spin Column*) ditempatkan kembali ke *tube collection* 2 ml yang baru. Kemudian ditambahkan 500 µl larutan C5 pada debris (*MB Spin Column*) dan disentrifugasi pada 15.000 x g selama 1 menit. Supernatan (*flow-through*) dibuang dan ditempatkan debris (*MB Spin Column*) ke dalam *Tube Collection* 2 ml yang baru. Disentrifugasi kembali dengan kecepatan 16.000 x g selama 2 menit dan ditempatkan *MB Spin Column* dengan hati-hati ke dalam *elution tube* 1,5 ml yang baru (tersedia). Larutan C6 ditambahkan 100 µl ke dalam *elution tube* yang mengandung debris tersebut kemudian disentrifugasi kembali pada 15.000 x g selama 1 menit. Debris yang terjadi dibuang dan supernatan yang mengandung DNA dikoleksi untuk diuji kualitatif dan kuantitatif.

3.4.1.2 Prosedur *PowerSoil Kit* dengan perlakuan awal terhadap sampel

Isolasi DNA bakteri dari sedimen tanpa kultivasi pada metode ini juga masih menggunakan prosedur Isolasi DNA bakteri dari sedimen tanpa kultivasi pada metode ini juga masih menggunakan prosedur *Kit* ekstraksi DNA DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018). Namun sebelum tahap ekstraksi DNA bakteri dilakukan, sampel diperlakukan menggunakan dua proses. Tujuan perlakuan yang

diberikan untuk pemecahan dinding sel dari bakteri. Adapun prosedur tersebut sebagai berikut:

Freezing and Thawing

Ekstraksi DNA diawali dengan melakukan metode *freezing and thawing* yang dimodifikasi dari MorÉ *dkk.*, (1994) dengan cara: menimbang sampel sedimen sebanyak 6 gr dan dimasukkan ke dalam *tube centrifuge* 15 ml. Memasukkan 3,5 ml air laut filter. Dilakukan *freezing and thawing* selama 3x dimana *freezing* selama 5 menit ke dalam es batu dan ethanol, *thawing* dimasukkan dalam *water bath* selama 2 menit dengan suhu 65°C. Kemudian sampel didiamkan sesaat sampai terjadi pemisahan antara supernatan dan pellet. Mengambil supernatan sebanyak 1.8 ml dan dimasukkan ke dalam dua *tube microcentrifuge* 2 ml. Sampel sisa pada *tube centrifuge* 15 ml di atas, disimpan dalam *freezer*.

Supernatan yang ada dalam dua *tube microcentrifuge* 2 ml disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dibuang. Memasukkan 500 µl air laut yang telah difilter pada masing-masing *tube*. Dicampurkan dan dijadikan 1 *tube* menggunakan *micropipette* selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan dipertahankan pellet yang ada, pellet yang ada dipreparasi selanjutnya menggunakan prosedur dari DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018) seperti yang telah diuraikan di atas. Secara lebih ringkas dapat dilihat pada lampiran 4.

3.4.1.3 Ekstraksi DNA Bakteri Kontrol Positif

Penelitian ini menggunakan kontrol positif sebagai pembanding. Kontrol positif yang digunakan yakni stok bakteri simbiosis dengan alga *Gracillaria sp.* yang diambil

dari Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut FPIK UNSRAT yang telah dikultur pada media agar di Laboratorium. Terlebih dahulu, bakteri diremajakan pada media *Nutrien broth* dengan cara sebagai berikut:

Preparasi media Nutrien Broth (NB)

Menimbang 0,5 gr NB dan masukkan ke dalam *Erlenmeyer* dan ditambahkan 50 ml aquades, selanjutnya diaduk hingga tercampur sempurna. Kemudian dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi dengan masing-masing tabung berisi sebanyak 10 ml. Media disterilkan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama \pm 1 jam. Setelah itu media *Nutrien broth* didiamkan hingga dingin, kemudian diinokulasikan satu lup bakteri yang telah dikultur dengan menggunakan jarum ose steril selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C, sampai ditandai dengan terjadinya kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri tersebut.

Kultur bakteri pada *Nutrien broth* dipindahkan kedalam 4 *tube eppendorf* 1,5 ml. Setelah itu, semua *tube* disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet pada 4 *tube* disatukan ke dalam *tube eppendorf* baru. Pellet disentrifugasi kembali agar memastikan terjadinya pemisahan yang lebih sempurna antara pellet dan supernatan. Supernatan dibuang, kemudian pellet dipreparasi untuk ekstraksi DNA menggunakan prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018).

3.4.2 Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kualitas DNA, dengan cara kualitatif. Langkah awal yang dilakukan adalah dengan pembuatan gel agarose dengan cara melarutkan 0,5 g bubuk agarose ke dalam 50ml 1 x TBE buffer.

Larutan agarose selanjutnya dipanaskan hingga mendidih, Setelah itu diangkat dan diamkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 μ l DiamondTM Nucleic Acid Dye. Tuangkan gel ke dalam cetakan *gel tray*, dibiarkan hingga mengeras selama \pm 30 menit. Agarose gel dapat digunakan selanjutnya untuk proses elektroforesis.

Dalam proses elektroforesis, sebanyak 4 μ l DNA hasil ekstraksi dan 1 μ l *loading dye* dicampur di atas *parafilm*. Campuran ini kemudian dimasukkan dalam sumur pada gel agarose dengan menggunakan *Micropipette*. 2 μ l 100bp ladder DNA marker dimasukkan ke dalam sumur yang berbeda/pertama sebagai penanda berat molekul. Elektroforesis menggunakan 1 x TBE buffer pada tegangan 80 volts selama 30 menit. Setelah itu gel diangkat dan letakkan di atas UV Trans-luminator untuk diamati keberadaan pita DNA. Hasil elektroforesis DNA ekstraksi bakteri sedimen didokumentasikan menggunakan kamera. Hasil isolasi DNA yang berkualitas baik akan menunjukkan pita tebal seperti kumis pada posisi dekat sumur (Annisaqois, 2018). Secara lebih ringkas prosedur elektroforesis gel dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.4.3 Spektrofotometer

Spektrofotometer digunakan dengan tujuan untuk melihat kuantitatif dari ekstraksi DNA. Sebelumnya, sampel diencerkan terlebih dahulu dengan cara, 30 μ l sampel dalam 2970 μ l aquades steril. Kemudian spektrofotometer dihidupkan dan diamkan selama 15 menit. Bersihkan kuvet, masukkan aquades sebanyak 3 ml sebagai blangko. Tentukan panjang gelombang λ 260 dan λ 280. Masukkan sampel yang telah diencerkan sebanyak 3 ml ke dalam kuvet berbeda. Kemudian dicatat hasil absorbansinya.

Selanjutnya dilakukan perhitungan kemurnian DNA dengan menggunakan rumus Sambrook *dkk.*, (1989) *dalam* Harahap (2017)

$$\text{Rasio Kemurnian DNA} = \frac{(\text{Abs Pada } \lambda A_{260})}{(\text{Abs Pada } \lambda A_{280})}$$

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sampel Sedimen Laut

Sampel sedimen yang dianalisis masing-masing diberi kode sesuai pada Tabel 1. Sampel 1 dan 2 merupakan sampel yang diambil pada zona litoral berada di daerah mangrove dengan dua titik berbeda. Sampel 3 diambil pada zona bentik. Sampel dapat dilihat pada lampiran 2. Adapun parameter lingkungan pada setiap titik pengambilan sampel, disajikan pada tabel 2.

Tabel 1. Kode sampel sedimen

Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3
SedE1 : Sed = Sedimen, E= Eulittora, 1 = Nomor Sampel	SedE2 : Sed = Sedimen, E= Eulittoral, 2 = Nomor sampel	SedBt3 : Sed = Sedimen, B = Bantik, 3 = Nomor sampel

Tabel 2. Parameter lingkungan titik pengambilan sampel sedimen

Parameter	SedE1	SedE2	SedBt3
Suhu (°C)	30.00	29.10	27.30
Salinitas (PSU)	37.00	36.50	35.40
Ph	7.18	7.39	8.02
O2 (mg/L)	2.72	2.07	6.28

4.2 Hasil Uji Kualitatif DNA

4.2.1 Isolasi DNA dengan Prosedur *PowerSoil Kit* Tanpa Perlakuan Awal Terhadap Sampel

Hasil isolasi DNA sampel SedE1 dan SedE2 tanpa perlakuan awal dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil elektroforesis DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2. Prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal.

Berdasarkan hasil visualisasi sampel DNA bakteri sedimen laut tanpa kultivasi yang dilakukan pada kode sampel SedE1 dan SedE2, menggunakan metode DNeasy® *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal pada sampel, tidak menunjukkan adanya pita DNA. Hal ini dapat disebabkan karena proses perusakan atau penghancuran membrane/dinding sel dari bakteri tidak efektif pada saat proses lisis yang dilakukan dalam prosedur *PowerSoil Kit* Hanbook (2018), sehingga tidak terisolasi DNA dari bakteri yang ada pada sampel tersebut.

4.2.2 Isolasi DNA Prosedur *PowerSoil Kit* Dengan Perlakuan Awal Terhadap Sampel

Hasil isolasi DNA sampel SedE1, SedE2 dan SeBt3 setelah melewati proses *Freezing and thawing* yang dielektroforesis dan divisualisa dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil elektroforesis DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2, SedBt3. Setelah melewati proses *freezing and thawing*.

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis DNA bakteri sedimen sampel SedE1, SedE2 dan SedBt3 yang dilakukan dengan menggunakan prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018) yang dimodifikasi dan diawali dengan proses *freezing and thawing* (MorÉ dkk., 1994) menunjukkan adanya pita DNA. Adanya pita DNA menunjukkan bahwa DNA berhasil diisolasi dari sampel sedimen tersebut. Oleh sebab itu, sampel hasil isolasi DNA dengan perlakuan *freezing and thawing* dilanjutkan/dikirim ke PT Genetika Science, Jakarta untuk proses amplifikasi.

4.3 Hasil Uji Kuantitatif DNA

Uji ini dilakukan menggunakan spektrofotometer untuk melihat kemurnian DNA secara kuantitatif, kemudian dilakukan perhitungan kemurnian DNA dengan menggunakan rumus menurut Sambrook dkk., (1989) dalam Harahap (2017).

Hasil uji kemurnian DNA dengan menggunakan metode DNeasy® *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal untuk sampel sedimen SedE1 dan SedE2 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji kemurnian DNA bakteri sedimen SedE1, SedE2. Prosedur *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal.

Sampel	Panjang Gelombang (nm)		Konsentrasi (ml)	RasioAbsorbansi ($\lambda 260/\lambda 280$)
	$\lambda 260$	$\lambda 280$		
SedE1	0,066	0,059	3 ml	1,11
SedE2	0,003	0,006	3 ml	0,5

Hasil uji Kemurnian DNA dengan menggunakan metode DNeasy® *PowerSoil Kit* untuk sampel SedE, SedE2 dan SedBt3 dengan menggunakan proses *freezing and thawing* dimodifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.

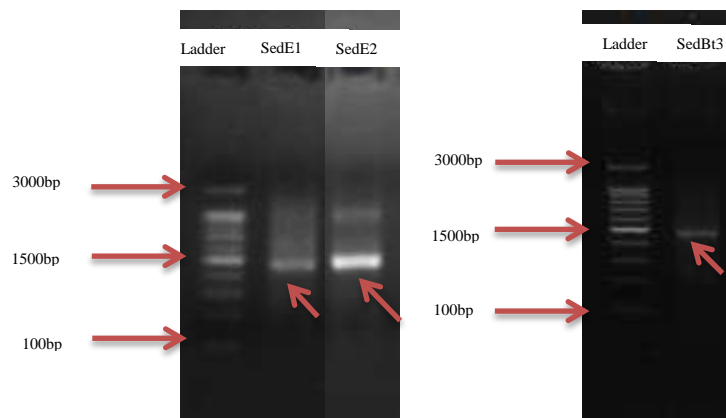
Tabel 4. Hasil uji kemurnian DNA bakteri sedimen SedE1, SedE2, SedBt3 setelah melewati proses *freezing and thawing*.

Sampel	Panjang Gelombang (nm)		Konsentrasi (ml)	RasioAbsorbansi ($\lambda 260/\lambda 280$)
	$\lambda 260$	$\lambda 280$		
SedE1	0,030	0,040	3 ml	0,75
SedE2	0,057	0,054	3 ml	1,05
SedBt3	0,019	0,026	3 ml	0,73

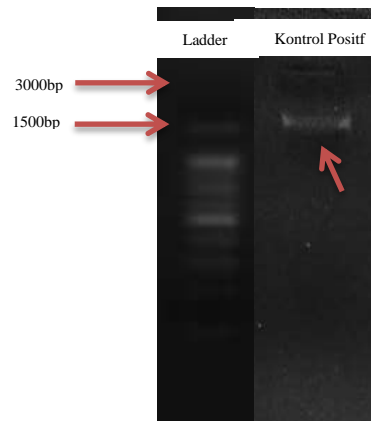
Berdasarkan hasil perhitungan kemurnian DNA pada masing-masing sampel yang telah diisolasi menggunakan metode *PowerSoil Kit* tanpa perlakuan awal pada sampel (Tabel 3) dan metode *PowerSoil Kit* dengan perlakuan awal terhadap sampel (Tabel 4) tersebut, diperoleh nilai kemurnian DNA yang rendah karena belum mencapai tingkat kualitas DNA yang baik, DNA dikatakan murni apabila memperoleh hasil berkisar 1,8 hingga 2,0 (Sambrook *dkk.*, 1989 dalam Harahap, 2017).

Berdasarkan hasil amplifikasi yang ditunjukkan lewat hasil elektroforesis, ketiga sampel DNA dari sampel SedE1, SedE2, Sedbt3 berhasil diamplifikasi yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA (Gambar 8). Pita DNA tersebut berada pada panjang sekitar 1400-1500bp untuk sampel SedE1, 1300-1600bp untuk sampel SedE2 dan 1400-1500bp untuk sampel SedBt3. Keberhasilan amplifikasi menunjukkan panjang pita yang diperoleh dari ketiga sampel berada pada kisaran panjang basa

nukleotida bakteri sesuai penelitian dari Abrar *dkk.*, (2019); Haryogya dan Ustadi, (2020) dengan berhasil mengidentifikasi bakteri lewat analisis molekular gen 16S rRNA, memperoleh hasil panjang basa 1500bp-1600bp. Dan munculnya pita DNA uji elektroforesis ditemukan pula pada DNA bakteri kultur yang dijadikan kontrol positif dengan panjang pita 1500bp (Gambar 9). Hasil-hasil tersebut menunjukkan keberhasilan dari isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi pada sedimen menggunakan prosedur *PowerSoil Kit* Hanbook (2018) yang dimodifikasi dengan proses *freezing and thawing* (MorÉ *dkk.*, 1994).



Gambar 8. Hasil amplifikasi DNA bakteri sedimen laut SedE1, SedE2, SedBt3.



Gambar 9. Hasil Elektroforesis DNA Bakteri kontrol positif

Berdasarkan hasil visualisasi amplifikasi DNA, ketebalan pita DNA yang terlihat menunjukkan perbedaan, dimana SedE1 memiliki pita DNA yang tipis dan memiliki *smear* yang nampak di bagian dekat pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi tidak utuh atau patah-patah (Sauer *dkk.*, 1998). Sampel SedE2 memperoleh pita DNA yang terang dan tebal ditemukan *smear* yang sangat tipis dan sampel SedBt3 memiliki pita DNA yang tidak terlalu tebal dan tidak ditemukan *smear*. Hal ini menunjukkan DNA berkualitas cukup baik sesuai pernyataan menurut Sauer *dkk.*, (1998) bahwa hasil uji DNA yang baik dengan elektroforesis ditunjukkan pita DNA yang tebal dan tampak atau tidak ada *smear* jika divisualisasi di atas sinar UV. DNA tebal dan terang secara kualitatif mengindikasikan konsentrasi hasil isolasi DNA yang dihasilkan tinggi, sedangkan pita DNA yang tipis mengindikasikan konsentrasi DNA yang dihasilkan kecil Hidayati *dkk.*, (2016). Konsentrasi DNA yang diperoleh pada masing-masing sampel dapat ditentukan oleh perlakuan fisik yang diberikan serta kemampuan buffer ekstraksi dalam pemecahan sel. Proses perusak sel secara fisik dengan menggunakan prosedur *freezing and thawing* dapat mempermudah buffer ekstraksi dalam memecah sel dari bakteri yang ada, sehingga DNA tersebut diperoleh dari sampel. Pemilihan suatu metode ekstraksi DNA bakteri tanpa kultivasi pada sedimen merupakan hal yang sangat penting dalam memperoleh kualitas DNA yang baik.

Sampel sedE1 dan sedE2 diambil dari lokasi yang sama yaitu pada zona litoral yang merupakan daerah pertumbuhan mangrove. Keberadaan bakteri di ekosistem mangrove memiliki arti yang sangat penting dalam proses penguraian daun mangrove

menjadi bahan organik yang digunakan sebagai sumber dan pertumbuhan mangrove itu sendiri (Dahuri *dkk.*, 2001). Bahkan bakteri juga memanfaatkan daun mangrove untuk memperoleh makanan (Das *dkk.*, 2006). Sampel SedE1 yang berasal dari daerah mangrove memiliki warna yang agak kehitam-hitaman memungkinkan sedimen tidak memiliki kandungan oksigen yang cukup. Keadaan ini ditandai dengan kadar oksigen yang rendah dari titik lokasi pengambilan sampel. Kondisi lingkungan ini memungkinkan bakteri aerob dan aerob fakultatif untuk hidup. Bakteri aerob membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya sedangkan bakteri aerob fakultatif dapat memperoleh energi dengan oksigen dan mampu bertahan dalam kondisi tidak ada oksigen dengan melakukan fermentasi secara anaerob (Hold, 1994; Chong *dkk.*, 2009).

Sampel sedimen SedBt3 diambil pada zona benthik kedalaman 31 meter, mikroba dalam zona benthik menggunakan oksigen untuk respirasi seluler ketika menguraikan detritus (Campbell *dkk.*, 2000). Keadaannya ini ditunjukkan dengan kandungan oksigen dari titik pengambilan sampel yang cukup tinggi (Tabel 2). Kemungkinan juga bakteri yang mendiami zona benthik termasuk bakteri rendah oksigen atau bakteri micro-aerophilic yaitu bakteri yang juga membutuhkan oksigen untuk bertahan hidup, namun dalam konsentrasi rendah. Bakteri jenis ini memerlukan oksigen karena tidak mampu melakukan fermentasi ataupun respirasi anaerobik (Thar, 2005).

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen laut dapat diisolasi, dengan menggunakan Prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* dengan melewati tahap freezing and thawing yang dimodifikasi terhadap sampel uji.
2. Kualitatif dan kuantitatif DNA sampel sedimen masih belum sepenuhnya memiliki tingkat kemurnian tinggi, namun dapat teramplifikasi.

5.2 Saran

Perlu dilanjutkan dengan menganalisis komunitas bakteri pada sedimen.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R.M and R. Bartha. 1993. *Microbial Ecology Fundamental and Applications*. 3rd ed. Redwood City, Calif Benjamin/Cummings Publishing Company. 12(576):563 p.
- Abrar, M., T.R. Ferasyi., Amiruddin., Fakhurrazi., Erina., Razali., M. Sabri., H. Abdullah., Zainuddin., A. Haris., Safika., M. Dewi., and R.A. Barus. 2019. Molecular Subtyping and DNA Sequencing Homology of *Escherichia Coli* O157:H7 isolated from Aceh cattle. *Internasional Conference on Biological Sciences and Biotechnology*. 305(1):1-7.
- Annisaqois, M. 2018. Analisis Molekuler DNA Alga Merah (Rhodophyta) *Kappaphycus* sp. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Sam Ratulangi, Manado. 44 hal.
- Bissett, A., C. Burke., P.L.M Cook., and J.P. Bowman. 2007. Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. *Environmental Microbiology*. 9(1):46-60.
- Campbell, N.A., J.B. Reece., L.G. Mitchell., L. Rahayu. 2000. *Biologi*. Ed-5. Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
- Chong, M.L., V. Sabaratnam., Y. Shirai., and M. Ali. 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(8):3277-3287.
- Dahuri, R., J. Rais., S.P. Ginting., dan Sitepu. 2001. *Pengolahan Sumber Daya Wilayah Pesisir dan Lautan Secara Terpadu*. PT. Pradnya Paramita. Jakarta. 328 hal.
- Dewi, K.T., G. Latuputty., Y.A. Priohandono., dan C. Purawanto. 2017. Respon Mikrofauna (Ostracoda) Terhadap Kondisi Lingkungan Sekitar Pulau Bangka, Sulawesi Utara. *Jurnal. Geologi Kelautan*. 15(1):1-9.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Cetakan I. Padang: Andalas University Press. 139 hal. ISBN: 978-602-60613-5-5.
- Dneasy Power Pro Kit Handbook. 2018. Ready to Load. <https://www.qiagen.com>. Diakses pada tanggal 22 agustus 2019.
- Das, S., P.S. Lyla and S.A. Khan. 2006. Marine Microbial Diversity and Ecology: Importance and Future Perspectives. General Article. *Currenct Science*. 90(10):1325-1335.

- Hedges, J.I. and J.M. Oades. 1977. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. Review Paper. *Org Geochem* 27(7/8): 319-361.
- Hambali, R. and Y. Apriyanti. 2016. Studi Karakteristik Sedimen dan Laju Sedimentasi Sungai - Daeng Kabupaten Bangka Barat. *Jurnal Fropil*. 4(2):165-174.
- Hidayati., E. Saleh., dan T. Aulawi. 2016. Identifikasi Keragaman Gen BMPR-1B (*Bone Morphogenetic Protein Receptor IB*) Pada Ayam Arab, Ayam Kampung dan Ayam Ras Petelur menggunakan PCR-RFLP. *Jurnal Peternakan*. 13(1):1-12.
- Haryogya, A.M., and Ustadi. 2020. Departement of Fhisherries, Faculty of Acriculture, Universitas Gadjah Mada. Isolation and Moleculr Identification of Chitinolytic Bacterium from Ronto. 147(03030). Publis online 10 February 2020. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703030>.
- Hold, J.G., N.R. Krieg., P.H.A. Sneath., J.T. Staley., S.T. Wiliams. 1994. Williams, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Edition, USA: Williams and Wilkins Pub. 18:787 p.
- Harahap, A.S. 2017. Uji Kualitas dan Kuantitas DNA beberapa Populasi Pohon Kapur Sumatera. *Journal. Animal Science and Agronomy Panca Budi*. 2(2):1-6.
- Irianto, K. 2016. Pemanfaatan Bakteri Untuk Keselamatan Lingkungan. Artikel. Mikrobiologi Lingkungan Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa. 22 hal.
- Liu, J.T., J.S. Huang., R.T. Hsu., and J.M. Chyan. 2000. The Coastal Depositio-nal System of a small mountain-nous river: a perspective form grain-size distributions. *Marine Geology*. 165:63–86.
- Leboffe, M.J. and B.E. Pierce. 2012. Brief Microbiology. Laboratory Theory & Application Ed-2. Englewood: Morton Publishing.
- Magdeldin, S. 2012. Gel Electrophoresis-Principles and Basics. Bros Scientigic Publishers Ltd, Oxford. 376 Hal. ISBN: 978-953-51-0458-2.
- MorÉ, M.I., J.B. Herrick., M.C. Silva., W.C. Ghiorse., and E.I. Madsen. 1994. Quantitative Cell Lysis of Indigenous Microorganisms and Rapid Extraction of Microbial DNA from Sediment. *American Society for Microbiologi* 60(5):1572-1580.

- Napitupulu, H.G., I.F.M. Rumengan., S. Wulur., E.L. Ginting., J.R.T.S.L. Rimper., B.H. Toloh. 2019. Identifikasi molekul bakteri pada media kultur *Brachionus rotundiformis* yang dimasukkan Ikan mentah sebagai sumber nutrisi. Jurnal. Ilmiah Platax. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Sam Ratulangi, Manado. 7(1):158-169.
- Phillips, K., N.Mc. Callum., and L. Welch. 2012. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA investigator kit (manual and automated). Forensic Science International: Genetics, 6(2):282-285.
- Pollard, P.C and K. Kogure. 1993. Bacterial Decomposition of Detritus in a Tropical Seagrass (*Syringodium isoetifolium*) Ecosystem, Measured with Methyl-3H) Thymidine. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 44:155-172.
- Purnawan, S., I. Setiawan., dan Marwantim. 2012. Studi sebaran sedimen berdasarkan ukuran butir di perairan Kuala Gigieng, Kabupaten Aceh Besar, Provinsi Aceh. Depik. 1(1):31-36.
- Passarge, E. 2007. Color Atlas of Genetics, 3rd edition Revised and Updated. Germany. Institute of Human Genetics, University Hospital Essen. Thieme. 497 p.
- Pandey R., A. Muller., C.A. Napoli., D.A. Selinger., C.S. Pikaard., E.J. Richards., J. Bender., D.W. Mount., and R.A. Jorgense. 2002. Analysis of Histone Acetyltransferase and Histone Deacetylase Families of Arabidopsis Thaliana Suggests Functional Diversification of Chromatin Modification Among Multicellular Eukaryotes. Nucleic Acids Res. 30(23):5036-55.
- Pambudiono, A., E. Suarsini. Dan M. Amin. 2016. Isolasi DNA Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium dari Limbah Cair Penapungan Agar. Seminar. Nasional Pendidikan dan Saintek. 103-107.
- Pakpahan, R. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Protease Termofilik dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara. Tesis. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara Medan. 89 hal.
- Pratita, M.Y.E., dan S.R. Putra. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Dari Sumber Mata Air Panas Di Sanggoriti Setelah Dua Hari Inkubasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Jurnal Teknik Pomits. 1(1):1-5.
- Riyanto, B., N. Rahmania., dan F. Idham. 2011. Energi Listrik Dari Sedimen Laut Teluk Jakarta Melalui Teknologi *Microbial Fuel Cell*. Jurnal. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia 14(1):32-42.

- Restu, M., Mukrimin., dan Gusmiaty. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona SureniMerr.*) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal. Natur Indonesia*, 14(2):138-142.
- Rangian, L., E.L. Ginting., S. Wulur., E. Kaligis., S. Tilaar., dan R. Tumbol. 2018. Amplifikasi Isolat Bakteri SF1 Symbion spons *Facaplysynopsis sp.* Dari Perairan Tongkakeina, Sulawesi Utara. *Jurnal. Ilmiah Platax. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Sam Ratulangi, Manado*. 6(2):77-82.
- Reimers, C.E., L.M. Tender., S. Fertig., and W. Wong. 2001. Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environ Sci Technol* 35:192-195.
- Sukiman, N. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Sedimen Makroalga *Caulerpa racemosa* di perairan puntonda kabupaten takalar. Skripsi. Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. 89 hal.
- Solis BioDyne. 2018 100 bp DNA Ladder Ready to Load. https://www.sbd.ee//EN/product/dna_ladders/100_bp_dna_ladder . Diakses pada tanggal 8 november 2019.
- Sauer, P., and M.J. Kang. 1998. *Quantitation DNA*. Qiagen News. 2: 23-26.
- Thar, R., and T. Fenchel. 2005. Survey of Motile Microaerophilic Bacterial Morphotypes in the Oxygen Gradient above a Marine Sulfidic Sediment. *American Society for Microbiology*. 71(7):3682-3691.
- Umami, R. 2019. Penentuan Kandungan Logam Berat Merkuri (Hg), Kadmium (Cd), dan Kromium (Cr) pada Sedimen di Perairan Lampung Selatan Secara Spektrofometri Serapan Atom. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. 68 hal.
- Wilson, K.M., and J.M Walker. 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7th edition. Cambridge University Press. New York. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. 101-149. ISBN: 978-0-521-73167.
- Wantania, L.L., S. Wullur., E.L Ginting., D.M.H. Mantiri., S.L. Undap., D.A. Sumilat., G.S. Gerung. 2019. Isolasi dan Amplifikasi gen 16S rRNA isolasi mikroba asosiatif pada alga merah *Kappaphycus alvarezii* dari perairan Desa Belang, kabupaten Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara. *Jurnal. Ilmiah Platax. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Sam Ratulangi Manado* 7(1):220-226.
- Wacono. 2013. Spektrofotometri UV-VIS Ready to Load. <https://wocono.wordpress.com/2013/03/04/spektrofotometri-uv-vis/>. Diakses pada tanggal 4 Oktober 2019.

- Yanlinastuti., dan S. Fatimah. 2016. Pengaruh Konsentrasi Pelarut untuk menentukan Kadar Zirkonium dalam Paduan U-Zr dengan menggunakan Metode Spektrofotometri UV-VIS.(17):22-33.
- Zuraida, R., N.Y. Gerhaneu., dan I.H. Sulistyawan. 2018. Karakteristik Sedimen Pantai dan Dasar Laut Teluk Papela, Kabupaten Rote, Provinsi NTT. Jurnal. Geologi Kelautan. 15(2): 81-94.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengambilan Sampel Sedimen



Lampiran 2. Sampel Sedimen

Sampel zona litoral

SedE1



SedE2



Sampel zona benthik



Lampiran 3. Bahan dan Alat

Bahan dan alat digunakan selama penelitian

A. Bahan		
Bahan Ekstraksi DNA		
No.	Nama Bahan	Fungsi
1.	Sampel sedimen	Sebagai sampel
2.	DNeasy® PowerSoil Kit (50) Qiagen	Kit untuk ekstraksi DNA
Bahan Elektroforesis Gel		
3.	Agarose	
4.	DNA Template	Sampel yang akan di elektroforesis
5.	<i>Diamond™ Nucleic Acid Dye</i>	Cairan yang menghasilkan pendar pada agarose ketika divisualisasi dengan Uv-Transluminator
6.	Loading Dye	Memberi warna DNA saat visualisasi di <i>UV-transilluminator</i>
7.	Ladder DNA Marker	Penanda berat molekul hasil isolasi
8.	TBE Buffer	Larutan penyangga gel agarose pada proses elektroforesis
Bahan Spektrofotometer		
9.	DNA Template	Sampel yang dispektrofotometer
10.	Aquades	Untuk pengenceran dan blangko

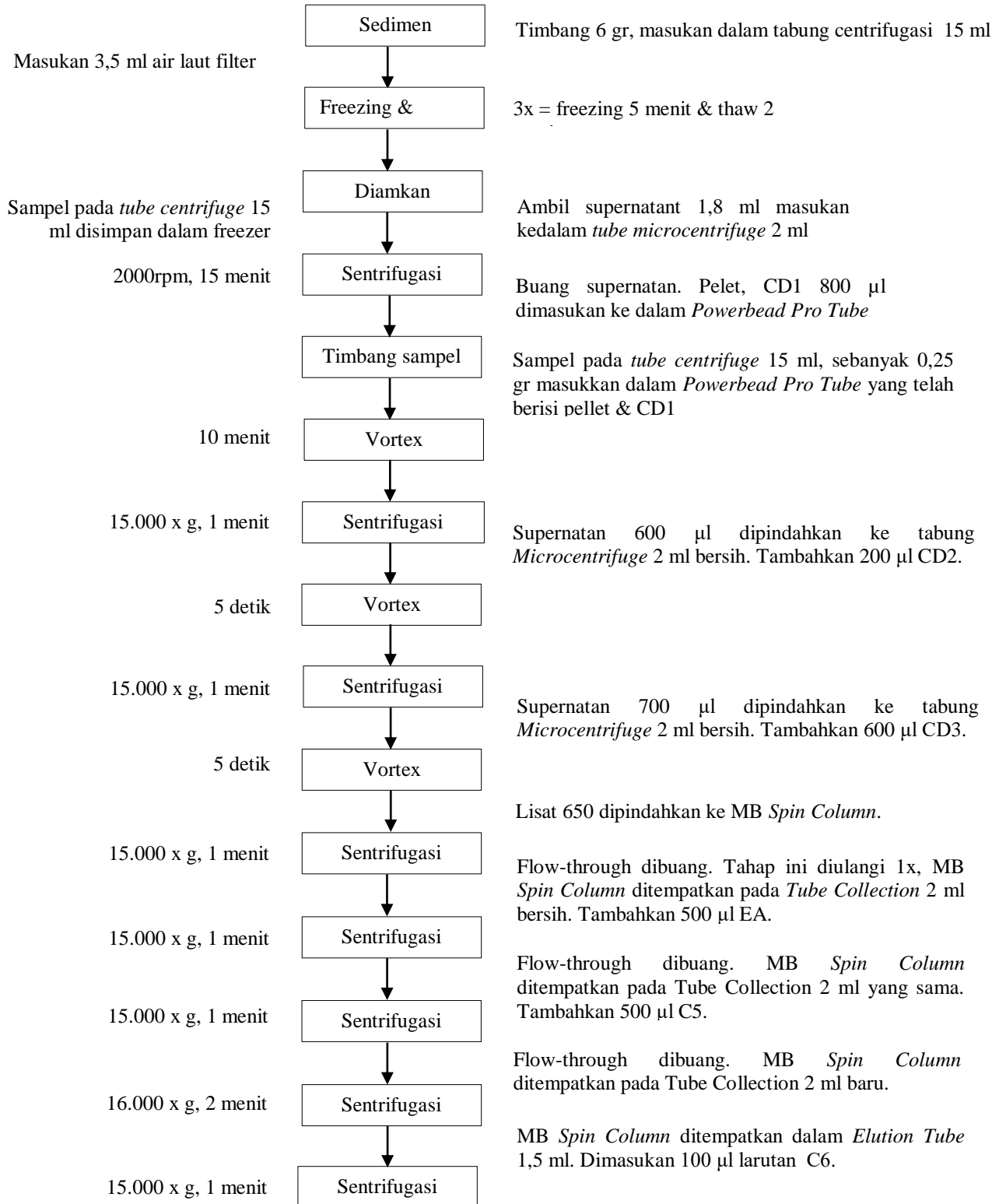
B. Alat		
Alat Pengambilan Sampel dan Parameter		
1.	<i>Tube Centrifuge</i> 15 ml	Tempat untuk sampel
2.	Sekop	Alat bantu untuk mengambil sampel
3.	<i>Coolbox</i>	Wadah Dry Ice, dijadikan tempat pendingin sampel
4.	Water Quality Cheker Horiba	Pengukur parameter
Alat Ekstraksi DNA		
No.	Nama Alat	Fungsi
1.	<i>Micropipette</i>	Mengambil dan memindahkan larutan yang digunakan
2.	<i>Centrifuge</i>	Memisahkan debris dan supernatant
3.	<i>Vortex</i>	Mengaduk larutan
4.	Sarung tangan	Melindungi tangan dari bahan kimia berbahaya dan mencegah

		kontaminasi.
5.	<i>Mask</i>	Melindungi terhirupnya bahan kimia berbahaya dan mencegah kontaminasi sampel.
6.	<i>Lab Clothes</i>	Melindungi tubuh dari bahan kimia berbahaya.
7.	<i>Laminar Air Flow</i>	Preparasi alat dan bahan agar tidak terkontaminasi.
8.	Spatula	Mengambil sampel sedimen
9.	Timbangan	Menimbang banyaknya sampel yang dibutuhkan
Alat Elektroforesis Gel		
8.	<i>Electroforesis chamber</i>	Memisahkan molekul-molekul DNA yang bermuatan listrik negatif dan mengukur ukuran DNA
9.	<i>Parafilm</i>	Tempat untuk menghomogenkan DNA Template dan loding Dye
10.	<i>Gel tray</i>	Tempat untuk Mengeraskan gel
11.	<i>Analytical Balance</i>	Menimbang bubuk agarose
12.	<i>Hot Plate</i>	Memanaskan gel agarose
13.	<i>UV-Transluminator</i>	Untuk memvisualisasai hasil elektroforesis
Alat Spektrofotometer		
14.	<i>Spektrofotometer UV-VIS</i>	Untuk analisis DNA secara kuantitatif
15.	Kuvet	wadah larutan untuk diuji pada spektrofotometer
16	Tisu	Untuk membersihkan kuvet

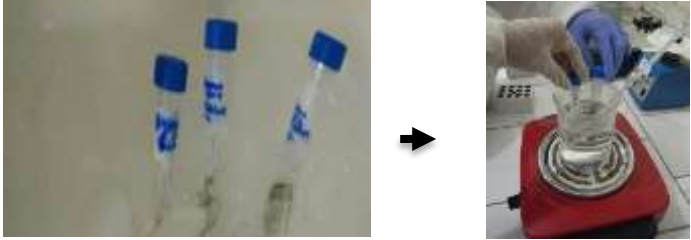



Bahan DNeasy® PowerSoil Kit (50) Qiagen

No.	Nama Bahan	Fungsi
1.	PowerBead Pro Tube	Penyangga yang akan membantu membubarkan partikel pada sampel untuk memecahkan sel mikroba
2.	CD1	Larutan yang dapat membantu lebih muda proses penghancuran sel
3.	CD2	Larutan untuk menghapus pencemaran materi organik dan anorganik yang dapat mengurangi kemurnian DNA
4.	CD3	Larutan yang akan menyesuaikan konsentrasi garam dari solusi DNA untuk memungkinkan pengikat DNA
5.	C5	Larutan ini menyingkirkan sisa garam, asam humat dan kontaminan lainnya, sehingga DNA tetap terikat pada selaput silika.
6.	EA	larutan mencuci atau mengambil protein dan kontan lainnya dari membran filter
7.	C6	pelepasan DNA yang lebih efisien dari kolom filter membran MB

Lampiran 4. Bagan Alir Pengekstraksian DNA



Lampiran 5. Dokumentasi Tahapan penelitian

No	Tahapan	Keterangan	Gambar
1.	Isolasi DNA	Freezing and Thawing	
		Ekstraksi	
2.	Elektroforesis		
3.	Spektrofotometer		

Lampiran 6. Bagan Alir Elektroforesis Gel

