

Analisis Komunitas Bakteri Pada Sedimen Dari Pulau Bangka Sulawesi Utara.

(*Analysis of Bacteria Community in the sediment from Bangka Island, North Sulawesi*)

Meivyarni Wangka¹, Stenly. Wullur², Esther D. Angkouw², Jane M. Mamuja², Reiny A. Tumbol², Elvy L. Ginting^{2*}

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

²Staf Pengajar Pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado - Sulawesi Utara, Indonesia.

* Corresponding Author: elvy_like@yahoo.com

Abstract

Marine sediments are nutrient-rich and is a suitable habitat of bacteria. This research is a preliminary study of molecular analysis to identify the bacteria in the sediments from the littoral area that covered by mangroves in Bangka Island, North Sulawesi. The purposes of this study are to obtain the uncultivated bacterial DNA genome which is used to identify the bacteria and bacterial community in the sediments. Isolation of DNA genome from uncultured bacterial was carried out by following the genomic DNA extraction procedure using the DNeasy® PowerSoil Extraction Kit. Before isolating the bacterial DNA, sample were went through freezing and thawing processes. The DNA isolation result was subsequently tested using electrophoresis and UV-Vis spectrophotometers. Subsequently the genomic DNA was amplified using Polymerase Chain Reaction and the bacteria were identified using Next Generation Sequencing (NGS) analysis. The results of this study showed that the DNA of uncultured bacteria from sediment have the purity of 1.05 and the DNA amplification band was detected at 1300-1600bp. The bacteria in Bangka Island, North Sulawesi sediments were consisted of *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* and *Proteobacteria* respectively. Phylum *Proteobacteria* was found has the highest relative abundance in the sediment.

Keywords : *Bacteria, Deoxyribo Nucleic Acid, Sediment, Uncultured.*

ABSTRAK

Sedimen laut merupakan suatu habitat yang kaya akan nutrient dan merupakan habitat dari bakteri. Penelitian ini merupakan tahapan awal dalam rangkaian analisis molekuler bakteri yang hidup di sedimen dari daerah litoral yang ditumbuhi oleh mangrove pada Pulau Bangka Sulawesi Utara. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan DNA genom bakteri tanpa kultivasi yang digunakan dalam analisis jenis dan komunitas bakteri pada sedimen. Isolasi DNA genom bakteri tanpa kultivasi dilakukan dengan mengikuti prosedur *Kit* ekstraksi DNA DNeasy® *PowerSoil*. Sebelum tahap isolasi DNA bakteri, sampel diperlakukan proses *freezing and thawing*. Hasil isolasi DNA diuji menggunakan elektroforesis dan spektrofotometer UV-Vis. DNA genom diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dan ditentukan jenis bakteri dengan menggunakan *Next Generation Sequencing analysis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA bakteri tanpa kultivasi memiliki kemurnian 1,05. DNA amplifikasi terdeteksi pada posisi 1300-1600bp. Dan jenis bakteri yang hidup pada sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara, terdiri dari filum *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* dan *Proteobacteria*. Kelimpahan tertinggi bakteri yang hidup pada sedimen tersebut adalah filum *Proteobacteria*.

Kata kunci : *Bakteri, Deoxyribo Nucleic Acid, Sedimen, Tanpa kultivasi.*

PENDAHULUAN

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 (Riyanto, 2011). Dan 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 (Pelezer dan Chan, 2007 *dalam* Irianto, 2016). Salah satu mikroorganisme yakni bakteri, 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. Komunitas bakteri pada sedimen perlu dipelajari untuk dapat dianalisis peran bakteri tersebut, terlebih khusus dalam sedimen pada daerah litoral dengan adanya mangrove yang hidup pada daerah tersebut. Hal ini agar dapat memahami peran bakteri dalam aliran nutrisi pada ekosistem, yang membutuhkan pemahaman proses-proses yang saling berinteraksi, memodulasi pengembangan dan keberlanjutan ekosistem mangrove itu sendiri (Kathiresan *dkk.*, 2001).

Untuk mengetahui komunitas bakteri dalam suatu ekosistem, dapat dilakukan secara molekuler. Dalam menganalisis suatu bakteri secara molekuler dibutuhkan DNA genom bakteri yang berkualitas tinggi (Restu *dkk.*, 2012) untuk mengkaji lebih jauh tentang keberadaan dan regulasi gen tersebut (Pambudiono *dkk.*, 2016). 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 asosiatif pada alga (Wantania *dkk.*, 2019).

Dilain pihak, dalam mempelajari komunitas bakteri, perlu dilakukan isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi. Oleh sebab itu perlu diketahui metode yang tepat dalam mengisolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen. Lewat penelitian ini berhasil diisolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen sehingga jenis bakteri pada sedimen dapat diketahui.

METODOLOGI PENELITIAN

Sedimen yang dijadikan sebagai objek penelitian diambil dari Pulau Bangka, Sulawesi Utara (Gambar 1). Sampel sedimen diambil pada zona litoral yakni pada daerah mangrove. Sampel diambil pada kedalaman ± 30 cm menggunakan bantuan sekop, dimasukkan pada *tube centrifuge* 15 ml dan dimasukkan dalam *cool box* serta dimasukkan pendingin *Dry Ice*. Pada saat pengambilan sampel, parameter lingkungan titik pengambilan sampel diukur seperti suhu, salinitas, pH dan kandungan oksigen.

Isolasi DNA Bakteri Pada Sedimen Laut

Isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi. Isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi menggunakan prosedur *Kit* ekstraksi DNA DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018). Namun sebelum tahap isolasi DNA bakteri dilakukan, sampel diperlakukan proses *freezing and thawing* yang dimodifikasi dari MorÉ *dkk.*, (1994). Tujuan perlakuan ini untuk pemecahan dinding sel dari bakteri. Adapun prosedur tersebut sebagai berikut: 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*. Sentrifugasi 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* selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet dipreparasi selanjutnya menggunakan prosedur dari DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018) untuk isolasi DNA bakteri.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel di Pulau Bangka, Sulawesi Utara

Isolasi DNA Bakteri Kontrol Positif

Penelitian ini menggunakan kontrol positif sebagai pembanding. Kontrol positif yang digunakan adalah bakteri yang dikultur pada media agar dan telah tersedia di laboratorium. Terlebih dahulu, bakteri diremajakan pada media *Nutrien broth*.

Kultur bakteri pada *Nutrien broth* dipindahkan ke dalam 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 isolasi DNA menggunakan prosedur DNeasy® *PowerSoil Kit* Hanbook (2018).

Elektroforesis Gel

Elektroforesis dilakukan untuk melihat keberhasilan dari isolasi DNA.

Langkah awal yang dilakukan adalah dengan pembuatan gel agarose dengan cara melarutkan 0,5 gr bubuk agarose ke dalam 50ml 1 x TBE buffer dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah itu diamkan selama 10 menit, selanjutnya ditambahkan 1 µl Diamond™ Nucleic Acid Dye. Tuangkan gel ke dalam cetakan *gel tray*, dibiarkan hingga mengeras selama ± 30 menit. Agarose gel dapat digunakan selanjutnya untuk proses elektroforesis.

Dalam proses elektroforesis, sebanyak 4 µl DNA hasil isolasi dan 1 µl *loading dye* dicampur di atas *parafilm*. Campuran ini kemudian dimasukkan dalam sumur pada gel agarose. 1000bp ladder DNA marker digunakan sebagai penanda. Elektroforesis menggunakan 1 x TBE buffer pada tegangan 80 volts selama 30 menit. Setelah itu gel letakkan di atas UV Trans-luminator dan didokumentasikan menggunakan kamera. Hasil isolasi DNA yang berkualitas baik akan menunjukkan

pita tebal seperti kumis pada posisi dekat sumur (Annisaqois, 2018).

Spektrofotometer UV-Vis

Kemurnian dari DNA yang diisolasi, diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebelumnya, dilakukan pengenceran sampel sebanyak 100 kali. Selanjutnya diuji menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang $\lambda 260$ dan $\lambda 280$, dan dibaca absorbansinya. Lebih lanjut dilakukan perhitungan kemurnian DNA dengan menggunakan rumus Sambrook *dkk.* (1989).

$$\text{Rasio Kemurnian DNA} = \frac{(\text{Abs Pada } \lambda \text{ A260})}{(\text{Abs Pada } \lambda \text{ A280})}$$

DNA yang berhasil diisolasi, dikirim ke PT Genetika Science, Jakarta untuk diamplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan ke Novogene, Beijing untuk analisis jenis bakteri dengan menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel sedimen

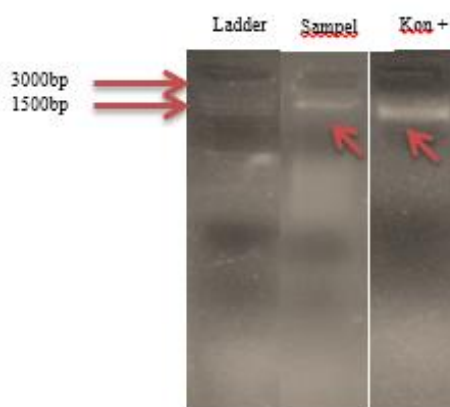
Sampel yang diperoleh yaitu sampel sedimen litoral di daerah mangrove (Gambar 2) dengan parameter lingkungan: suhu 29.10°C, salinitas, 36.50; pH, 7.39 dan kandungan oksigen 2.07.

Isolasi DNA Bakteri

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis DNA bakteri pada sedimen terlihat adanya pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa DNA bakteri tanpa kultivasi berhasil diisolasi dari sampel sedimen tersebut. Posisi pita yang sama terdapat pada hasil isolasi DNA bakteri kultur sebagai kontrol positif. Oleh sebab itu, sampel hasil isolasi DNA dianalisis lebih lanjut untuk diamplifikasi dan penentuan jenis bakteri dengan menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS).



Gambar 2. Sampel sedimen



Gambar 3. Hasil elektroforesis DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen dan bakteri *control* positif.

Hasil Uji DNA dengan Spektrofotometer UV-Vis

Uji ini dilakukan menggunakan spektrofotometer, untuk melihat kemurnian DNA hasil isolasi. Berdasarkan hasil perhitungan kemurnian DNA (Tabel 1) diperoleh nilai kemurnian DNA 1,05. Sambrook *dkk.*, 1989 menyatakan bahwa

DNA dikatakan murni apabila memperoleh hasil berkisar 1,8 hingga 2,0. Apabila nilai tersebut kurang dari 1,8 maka dapat terindikasi DNA tersebut masih belum murni. Hal ini disebabkan karena DNA tersebut masih terkontaminasi protein dan fenol (Sulandri dan Zein, 2003).

Tabel 1. Hasil uji kemurnian DNA

Sampel	Panjang Gelombang (nm)		Konsentrasi (ml)	Rasio Absorbansi ($\lambda 260/\lambda 280$)
	$\lambda 260$	$\lambda 280$		
Sedimen	0,057	0,054	3 ml	1,05

Amplifikasi DNA Bakteri

Berdasarkan hasil amplifikasi yang ditunjukkan lewat hasil elektroforesis, sampel DNA bakteri pada sedimen berhasil diamplifikasi dengan adanya pita DNA (Gambar 4). Pita DNA tersebut berada pada panjang sekitar 1300-1600bp. Keberhasilan amplifikasi menunjukkan panjang pita yang diperoleh 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 panjang basa 1500bp-1600bp, Napitupulu *dkk.*, (2019) amplifikasi DNA bakteri dengan panjang basa 1400bp Rangan *dkk.*, (2018) amplifikasi DNA bakteri dengan panjang basa 1600bp. Hasil-hasil tersebut menunjukkan keberhasilan dari isolasi DNA bakteri tanpa kultivasi pada sedimen.

Pita DNA yang dihasilkan, terang dan tebal dengan *smear* yang sangat tipis. Hal ini menunjukkan DNA berkualitas cukup baik. Sauer *dkk.*, (1998) mengemukakan bahwa hasil uji DNA yang baik ditunjukkan lewat pita DNA yang tebal dan tampak atau tidak ada *smear* jika hasil elektroforesis 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 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.

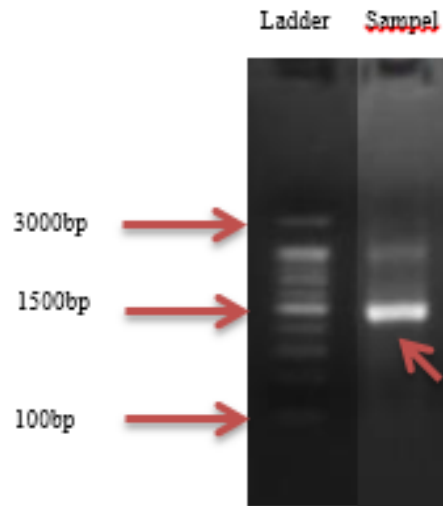
Komunitas Bakteri Pada Sedimen

Hasil analisis komunitas/kelimpahan bakteri dengan menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS) pada sampel sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan hasil analisis NGS yang diperoleh, bakteri yang hidup pada sedimen terdiri dari Filum: *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*. Kelimpahan bakteri tertinggi dari sampel tersebut yaitu *Proteobacteria*. *Proteobacteria* bersifat fotosintetik, heterotrofik atau kemolitotrofik. Pada umumnya bakteri ini merupakan Gram negatif, memiliki flagel atau tidak memiliki flagel, sel dapat berbentuk batang, spiral atau bulat, bersifat aerob, fakultatif ataupun anaerob (Hold *dkk.*, 1994). Menurut Gao *dkk.*, (2016), filum *Proteobacteria* dapat ditemukan pada lingkungan dengan pH 5.5–8.2 Filum

Proteobacteria seperti genus *Pseudomonas*, optimum tumbuh pada suhu 20–37°C. Kondisi lingkungan tempat pengambilan sampel sesuai untuk pertumbuhan/perkembangan *Proteobacteria* yaitu pH 7.39 dan suhu

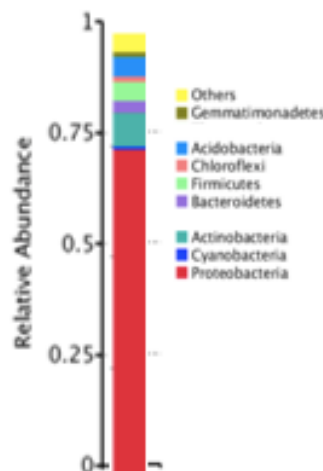
29.10°C. Selain *Proteobacteria*, *Actinobacteria* memiliki kelimpahan yang cukup tinggi. *Actinobacteria* adalah bakteri Gram-positif dan merupakan bakteri yang dapat hidup pada daerah terestrial/litoral maupun akuatik (Servin dkk., 2008).



Gambar 4. Hasil amplifikasi DNA.

Actinobacteria sangat penting bagi tumbuhan karena tumbuhan bergantung pada kontribusi bakteri ini terhadap sistem tanah. Dalam tanah, bakteri ini membantu menguraikan bahan organik dari organisme mati sehingga molekul dapat diambil kembali oleh tumbuhan. Sampel sedimen diambil di daerah 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).



Gambar 5. Grafik kelimpahan relative bakteri pada sedimen.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen dapat diisolasi, dengan menggunakan Prosedur DNeasy® PowerSoil Kit, melewati proses freezing and thawing yang dimodifikasi terhadap sampel uji. Kemurnian DNA bakteri tanpa kultivasi dari sedimen yang berhasil diisolasi masih belum sepenuhnya murni akan tetapi dapat diamplifikasi. Komunitas bakteri yang hidup pada sedimen di Pulau Bangka Sulawesi Utara. terdiri dari Filum: *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*. Kelimpahan tertinggi bakteri yang hidup pada sampel di daerah mangrove tersebut yaitu filum *Proteobacteria*.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Annisaoqis, 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.
- 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. Prihandono., dan C. Purawanto. 2017. Respon Mikrofauna (Ostracoda) Terhadap Kondisi Lingkungan Sekitar Pulau Bangka, Sulawesi Utara. *Jurnal. Geologi Kelautan*. 15(1):1-9.
- Das, S., P.S. Lyla and S.A. Khan. 2006. Marine Microbial Diversity and Ecology: Importance and Future Perspectives. *General Article. Current Science*. 90(10):1325-1335.
- Gao, P., H. Tian., Y. Wang, Y. Li., Xie, J. and T. Ma. 2016. Spatial isolation and environmental factors drive distinct bacterial and archaeal communities in different types of petroleum reservoirs in China. *6(20174):1-12*.
- 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 Fisheries, 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. Williams. 1994. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Edition, USA: Williams and Wilkins Pub. 18:787.
- Handbook. 2018. Ready to Load. <https://www.qiagen.com>. Diakses pada tanggal 22 agustus 2019.
- Irianto, K. 2016. Pemanfaatan Bakteri Untuk Keselamatan Lingkungan. Artikel. *Mikrobiologi Lingkungan Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa*. 22 hal.
- 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 Microbiology 60(5):1572-1580.
- Kathiresan, K., B.L. Bingham. 2001. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. *Avances in Marine Biology*. 40(40):81-251.
- Napitupulu, H., Rumengan, I., Wullur, S., Ginting, E., Rimper, J., & Toloh, B. (2019). *Bacillus* sp. As a Decomposition Agent in The Maintenance of *Brachionus rotundiformis* Which Uses Raw Fish As a Source of Nutrition. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 7(1), 158-169. doi:<https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22627>
- Pambudiono, A., E. Suarsini., M. Amin. 2016. Isolasi DNA Genom Bakteri Potensial Pengkelat Logam Berat Kadmium dari Limbah Cair Penapungan Agar. Seminar Nasional Pendidikan dan Saintek. 103-107.
- 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 Sureni*Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal. Natur Indonesia*, 14(2):138-142.
- Rangian, L., Ginting, E., Wullur, S., Kaligis, E., Tilaar, S., & Tumbol, R. (2018). Amplification Of Bacterial Isolate Sf1 Associated With Sponge *Facaplysynopsis* sp. From Tongkeina, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 6(2), 77-82. doi:<https://doi.org/10.35800/jip.6.2.2018.20636>
- Sulandri S & M.S.A Zein. 2003. Panduan Praktis Laboratorium DNA. Bidang Zoologi LIPI. Bogor
- Sambrook, J., E.F Fritsch., and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press. University of Texas South Western Medical Center, Texas. (516):367-8432.
- Servin, J.A., C.W. Herbold., R.G. Skophammer., J.A. Lake. 2008. Evidence Excluding the Root of the Tree of Life from the Actinobacteria. *Mol. Biol.* 25(1):1-4.
- Sauer, P., and M.J. Kang. 1998. *Quantitation DNA*. *Qiagen News*. 2: 23-26.
- 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.
- Wantania, L., Wullur, S., Ginting, E., Mantiri, D., Undap, S., Sumilat, D., & Gerung, G. (2019). Isolation and amplification of 16S rRNA gen of Associated Microbial isolates in Red Algae *Kappaphycus alvarezii* from Belang, Southeast Minahasa Regency, North Sulawesi. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 7(1), 220-226. doi:<https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22808>