

AMPLIFIED RIBOSOMAL DNA RESTRICTION ANALYSIS (ARDRA) BAKTERI DENGAN POTENSI ANTIMIKROB YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS *Jaspis* sp.

(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDA) of bacterial with a potential of antimicrobial association with the sponge Jaspis sp.)

Hermawaty Abubakar¹

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Papua, Manokwari 98314, Papua Barat

ABSTRACT

*Sponges are one of the components that compose coral reef which have a potential bioactive substance that has not been utilized. Sponges are generally able to survive in marine waters where nutrients are poor because of associations with other organisms, especially bacteria. This study aimed to isolate and characterize bacteria (endosymbiont and ectosymbiont) that produce antimicrobial compounds, and analyze genetic diversity based on Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). The results of isolation obtained 138 bacterial isolates, which are 70 endofit isolates and 68 surface isolates respectively. The results obtained, based on antimicrobial test, was 32 bacterial isolates (45.71%) of the total bacterial isolates that have endofit antimicrobial activity, whereas on the surface bacteria, 20 bacterial isolates (29.41%) of the total surface of the bacterial isolates also have antimicrobial activity. Genetic diversity was carried out on 30 isolates that has the best antimicrobial activity. Amplification of 16S rRNA gene is done using specific primers, 63f and 1387r. The profile of 16S rRNA gene band shows a high diversity, which is generated after cutting with three restriction enzymes i.e. *RsaI*, *HaeIII* and *HinfI*. The three restriction enzymes have different cuts and properties. Construction of phylogenetic trees based on analysis of Amplified Ribosomal DNA restriction, grouped 30 isolates from the sponge *Jaspis* sp. which have a microbial activity on seven filotipe. This grouping is based on the similarities cuts of sites of each isolate after restriction by three different restriction enzymes.*

Keywords: *Bacteria, associations, Jaspis sp., ARDRA.*

PENDAHULUAN

Mikroorganisme laut merupakan sumber kandungan senyawa bioaktif baru yang saat ini banyak menjadi perhatian. Bentuk pertumbuhan bakteri pada perairan laut yang miskin nutrisi, banyak dijumpai dengan cara hidup berasosiasi dengan organisme laut bentik, seperti sponge dan karang. Sponge merupakan biota laut yang tersebar pada daerah perairan pantai yang dangkal hingga kedalaman 5,5 km. Tubuh hewan ini terdiri dari jaringan rangka yang disebut spikula. Spikula tersebut mengandung senyawa kimia yaitu kalsium, karbonat, silika, serat kolagen dan serat spongin yang lentur (Castro & Huber, 2005).

Sponge adalah hewan berpori yang termasuk "filter feeder" yaitu hewan yang memiliki cara makan dengan menyaring air laut yang

mengandung makanan melalui pori-pori (ostium). Makanan porifera berupa mikroorganisme atau sisa organisme yang telah mati yang berada di kolom air. Selain dijadikan makanan, mikroorganisme juga dijadikan simbiosis dari sponge karena mikroorganisme memakai tubuh sponge yang berpori-pori sebagai inangnya untuk tempat hidup dan perlindungan. Hal ini dapat dilihat dari asosiasi antara sponge dengan bakteri. Bakteri dapat memberikan kontribusi untuk pertahanan hostnya dengan ekskresi antibiotik dan substansi bioaktif lainnya. Secara partikular organisme laut yang sesil seperti sponge diperkirakan sangat bergantung pada mekanisme pertahanan kimia untuk melawan hewan-hewan pemangsa dan perlekatan dari mikroorganisme patogenik.

Jenis senyawa metabolit sekunder yang berhasil diisolasi dari bakteri yang bersimbiosis dengan sponge memperlihatkan kuantitas yang lebih banyak dari mikroorganisme laut lainnya. Jenis senyawa metabolit sekunder dari bakteri yang bersimbiosis dengan sponge sangat bervariasi yaitu dari golongan terpenoid, alkaloid, polyketida, peptida siklik, derivat dari asam lemak dengan berat molekul kecil, heterosiklik, hingga brominated pyrroles).

Penggunaan teknik molekuler untuk mengidentifikasi bakteri telah umum dilakukan, salah satunya dengan analisis gen 16S rRNA untuk mengetahui phylogeni, penyebaran dan karakteristik bakteri yang bersimbiosis dengan sponge. Analisis gen 16S rRNA dapat dilanjutkan dengan metode ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis). Teknik molekuler ini telah banyak digunakan untuk menganalisis komunitas bakteri pada berbagai lingkungan, termasuk sponge sebagai simbiosis dari berbagai bakteri laut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri (endosimbion dan ektosimbion) penghasil senyawa antimikrob dan menganalisis keragaman genetiknya berdasarkan amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel sponge *Jaspis* sp. yang diambil dari perairan sebelah barat dari kepulauan Waigeo, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat.

Metode Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara acak yaitu dengan menyusuri dasar laut. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel (Whirl-Pak, Nasco, USA) yang telah diisi dengan oksigen murni, lalu ditempatkan dalam *cool box* untuk dianalisis secara mikrobiologis di laboratorium.

b. Isolasi Bakteri dari Sampel Sponge

Permukaan sampel dibilas dengan air laut steril, sehingga hanya bakteri dengan daya gabung yang kuat saja yang akan ter-*sampling*. Untuk isolasi pada bagian dalam jaringan sponge diambil

dengan cara memisahkan bagian pinacoderm dengan bagian mesophil. Bagian mesophil diambil dengan ukuran + 1 x 1 cm lalu digerus dan diencerkan dengan Buffer Phospat Saline (BPS) steril dengan perbandingan 1 : 1 (Kim, *et al.* 2006), sedangkan untuk mengisolasi bakteri dari permukaan luar menggunakan "swab steril" (Wahl, *et al.* 1994).

c. Skreening Bakteri Penghasil Senyawa Bioaktif (Antibakteri dan Antifungi)

Pengujian Aktivitas Antibakteri. Isolat yang telah murni digoreskan pada permukaan media yang telah disebar dengan bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan terdiri dari bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*, EPEC K-11, *Vibrio harveyii*, *Pseudomonas aerogenosa* patogen manusia, serta bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* patogen manusia, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA UNIPA).

Pengujian Aktivitas Antikhamir. Isolat hasil pemurnian digoreskan pada permukaan media yang telah disebar dengan khamir uji *Candida albicans* dan *C. tropicalis* yang ditumbuhkan pada media PDA (Potato Dextrose Agar).

d. Uji fisiologis

Pengujian fisiologis dilakukan dalam dua metode berdasarkan hasil pewarnaan gram. Isolat dengan gram negatif dilakukan dengan menggunakan identification strip (Kit Microgen Bioproducts GN ID-A dan GN ID-B) sedangkan untuk gram positif dilakukan dengan identifikasi parsial yang merujuk ke kelompok *Bacillus* meliputi pengecatan gram, pengecatan spora dan uji katalase.

e. Analisis Molekuler gen 16S rRNA

Isolasi Genom. Isolat bakteri yang menunjukkan kemampuan antibakteri dan antifungi ditumbuhkan pada media SWC dan diinkubasi *shaker* selama 24 jam, dengan komposisi media 5 gr/l bacto pepton, 1 gr/l yeast ekstrak dan 3 ml/l glicerol. Isolat bakteri yang telah ditumbuhkan pada media SWC diambil sebanyak 1,5 ml dan disentrifugasi (18.000xg) selama 10 menit untuk mendapatkan pelet bakteri. Pelet ini digunakan untuk mengekstraksi DNA genom dengan metode Sambrook dan Russel (2001).

Perbanyakkan 16S rRNA dengan PCR. Perbanyakkan 16S rRNA dengan menggunakan PCR Perkin Elmer 2400, dengan menggunakan primer 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387r (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') (Marchesi, 1998) yang akan memperbanyak fragmen pada target 1300-pb. Produk PCR dapat diketahui dengan elektroforesis pada agarose 10% (wt/vol) selama 45 menit pada 70V/cm dengan TAE buffer 1X. Amplicon selanjutnya dipurifikasi dengan menggunakan Promega Kit sesuai dengan instruksi pemakaian.

Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). Setiap hasil purifikasi produk PCR 16S rRNA dipotong dengan menggunakan empat enzim restriksi yaitu RsaI, HaeIII, dan Hinf I Fermentas (Life Science). Volume reaksi tiap-tiap enzim restriksi terdiri atas 5 µl amplicon (1.5 µg), 2 µl buffer Tango 10X, enzim restriksi 2 U/µl, dan ddH₂O hingga volume 20µl, lalu diinkubasi selama 3 – 4 pada suhu 37 °C. Inaktivasi enzim dilakukan dengan menginkubasi pada suhu 65°C selama 20 menit. Produk restriksi selanjutnya dielektroforesis dengan menggunakan gel elektroforesis yaitu agarose 1% (wt/vol) dalam buffer TAE 1X. Fragmen-fragmen dari hasil pemotongan pita 16S rRNA tiap-tiap isolat merupakan data biner dan akan dianalisis menggunakan *software* Treecon pada windows ver1.3b (Van de Peer dan De Watcher, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

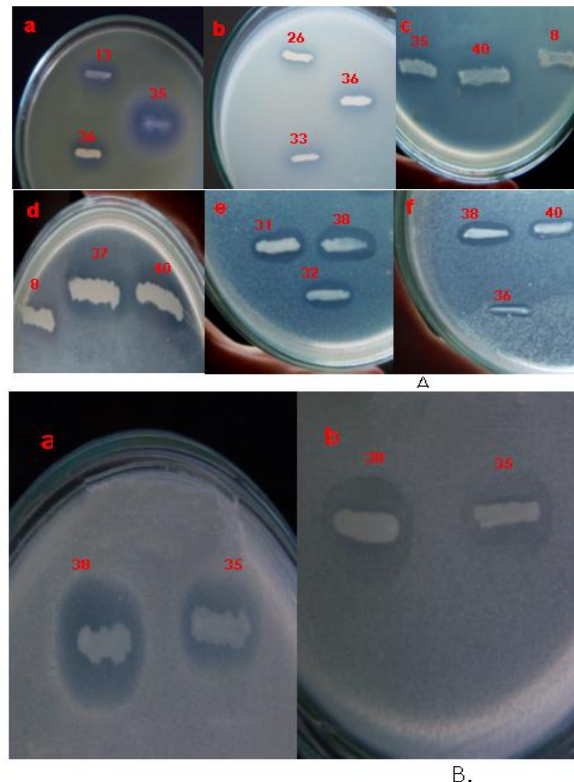
Hasil

a. Isolasi Bakteri dari SampelSponge

Pada penelitian ini diperoleh 138 isolat hasil isolasi bakteri yang memiliki potensi antimikrob dari sponge *Jaspis* sp., yaitu 70 isolat yang diisolasi dari bagian endofit dan 68 isolat dari bagian permukaan. Bakteri yang berasosiasi dengan sponge tersebut dapat berasal dari lingkungan perairan dimana sponge berada atau merupakan mikrobial simbiosis sponge pada saat masih tahap larva. Bakteri sebagai simbiosis dari sponge dapat berperan sebagai sumber makanan, patogen atau parasit dan sebagai simbiosis mutualistik. Bentuk mutualisme antara bakteri dan sponge ditunjukkan dengan adanya produksi senyawa antimikrob oleh bakteri *Vibrio* sp. yang berasosiasi dengan sponge *Hyatella* sp. (Miyashiro & Ikegami, 1994).

b. Skrening Isolat Penghasil Senyawa Bioaktif (Antibakteri dan Antifungi)

Skrening ini dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan dua kelompok mikroorganisme unicelluler yaitu bakteri (prokariotik) dan khamir (eukariotik). Kedua kelompok mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri dan khamir yang bersifat patogen.



Gambar 1. A. Hasil Uji aktivitas antibakteri beberapa isolat endofit terhadap pertumbuhan bakteri a. *S. aureus*, b. *V. harveyi*, c. *E. coli*, d. EPEC K11, e. *P. aerogenosa** dan f. *S. aureus**, B. Hasil Uji aktivitas antikhamir isolat endofit SAB E-35 dan SAB E-38 terhadap pertumbuhan khamir a. *C. albicans* dan b. *C. tropicalis*.

Indikator besarnya zona hambatan yang dihasilkan oleh isolat penghasil antimikrob dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri dan antikhamir isolat-isolat bakteri endofit dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri dan antikhmir isolat-isolat bakteri endofit

No	Isolat	Bakteri Uji						Khamir Uji	
		Sa	Sa*	Vh*	Ec	EPEC	Ps*	Cal*	Ctro*
1	SAB E-5	+	-	++	+	+	-	-	-
2	SAB E-7	++	-	++	+	-	-	-	-
3	SAB E-8	++	++	++	+	+	+++	+	+
4	SAB E-13	++	-	++	-	-	-	++	++
5	SAB E-14	+++	-	++	-	-	+++	-	-
6	SAB E-16	+++	-	++	-	-	-	-	-
7	SAB E-23	++	-	++	-	-	-	-	-
8	SAB E-25	++	-	++	-	-	-	-	-
9	SAB E-26	++	-	+	-	-	-	-	-
10	SAB E-31	+++	-	++	-	++	++	++	-
11	SAB E-32	++	+	++	++	++	++	++	+
12	SAB E-33	++	+	++	++	++	-	+++	+++
13	SAB E-35	+++	++	++	+	++	+++	++	++
14	SAB E-36	+	+	+	-	++	+++	-	-
15	SAB E-37	+++	+	++	++	+++	+++	+	-
16	SAB E-38	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
17	SAB E-39	+	-	+	-	++	-	-	++
18	SAB E-40	++	++	++	++	++	+++	+++	+
19	SAB E-41	+++	-	++	++	++	-	++	+
20	SAB E-42	++	-	++	-	++	-	-	-
21	SAB E-43	++	-	++	-	++	-	-	-
22	SAB E-45	++	-	++	-	++	-	-	-
23	SAB E-47	++	-	++	++	++	-	-	-
24	SAB E-49	++	-	++	-	++	-	-	-
25	SAB E-54	+++	-	++	++	++	-	-	-
26	SAB E-56	++	-	++	++	++	-	-	-
27	SAB E-57	+++	-	+++	++	++	-	-	-
28	SAB E-58	++	-	++	++	++	-	-	-
29	SAB E-65	+++	-	++	-	-	++	-	-
30	SAB E-66	+	-	+	++	++	-	-	-
31	SAB E-67	++	-	+	++	-	-	-	-
32	SAB E-68	++	-	+	-	-	-	-	-

Sa: *Staphylococcus aureus*; Sa*: *Staphylococcus aureus* patogen manusia; Bs: *Bacillus subtilis*; Vh: *Vibrio harveyii*; Ec: *Escherichia coli*; EPEC K-11: *Escherichia coli*; Pa: *Pseudomonas aerogenosa*; Cal: *Candida albicans*; Ctro: *Candida tropicalis*; *: Patogen; +: Zona bening kecil; ++: Zona bening sedang; +++: Zona bening besar; +: Waktu hingga terbentuknya zona bening lebih dari 24 Jam.

Pengujian aktivitas antibakteri dan antikhmir yang dilakukan pada isolat bakteri *surfaces* juga merupakan skrining awal. Hasil pengujian isolat bakteri *surfaces* dapat dilihat pada Tabel 2.

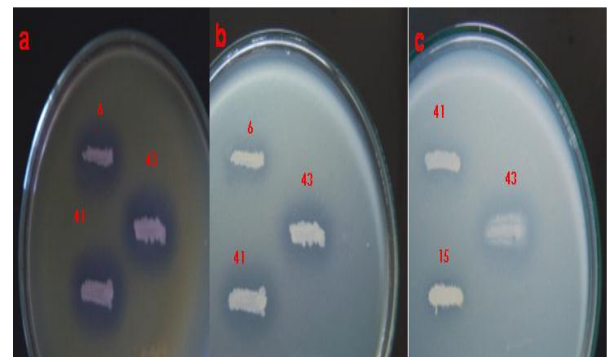
Berdasarkan hasil pengujian antimikrob, 32 (45,71%) dari total isolat bakteri endofit dan 20 (29,41%) bakteri permukaan memiliki aktivitas antimikrob (Gambar 2). Kemampuan isolat bakteri yang berasosiasi dengan sponge *Jaspis* sp. dalam menghambat pertumbuhan mikroba target, merupakan bentuk aktivitas antagonis yang diduga dilakukan dengan menghasilkan kandungan senyawa yang bersifat antimikrobial. Biosintesis senyawa antimikrobial berperan penting dalam proses pelekatan, kolonisasi target hingga

kompetisi dalam mendapatkan ruang dan nutrisi dengan mikroba lainnya (Romanengko *et al.*, 2008)

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri dan antikhmir isolat bakteri permukaan

No	Isolat	Bakteri Uji						Khamir Uji	
		Sa	Sa*	Vh*	Ec	EPEC	Ps*	Cal*	Ctro*
1	SAB S-6	+++	-	+++	+	+	++	-	-
2	SAB S-7	++	-	-	-	-	-	-	-
3	SAB S-15	+++	-	+	+	-	+++	-	-
4	SAB S-21	++	-	-	-	-	-	-	-
5	SAB S-30	+++	-	-	-	-	+++	-	-
6	SAB S-32	+++	-	++	-	+	-	-	-
7	SAB S-34	+++	-	-	-	-	-	-	-
8	SAB S-37	++	-	-	-	-	-	-	-
9	SAB S-40	+++	-	-	-	-	-	-	-
10	SAB S-41	+++	-	++	+	-	+++	-	-
11	SAB S-43	+++	-	++	+	+	+++	-	-
12	SAB S-47	++	-	-	-	-	-	-	-
13	SAB S-52	++	-	-	-	-	-	-	-
14	SAB S-53	++	-	++	+	-	-	-	-
15	SAB S-59	++	-	-	-	-	-	-	-
16	SAB S-60	++	-	-	+	-	-	-	-
17	SAB S-61	+	-	-	+	-	-	-	-
18	SAB S-62	+++	-	-	-	-	-	-	-
19	SAB S-65	++	-	-	-	-	-	-	-
20	SAB S-66	++	-	-	-	-	-	-	-

Sa: *Staphylococcus aureus*; Sa*: *Staphylococcus aureus* patogen manusia; Bs: *Bacillus subtilis*; Vh: *Vibrio harveyii*; Ec: *Escherichia coli*; EPEC: *Escherichia coli*; Pa: *Pseudomonas aerogenosa* patogen manusia; Cal: *Candida albicans*; Ctro: *Candida tropicalis*; +: Zona bening kecil; ++: Zona bening sedang; +++: Zona bening besar; +: Waktu hingga terbentuknya zona bening lebih dari 24 jam.



Gambar 2. Hasil Uji aktivitas antibakteri isolat bakteri *surfaces* terhadap pertumbuhan bakteri a. *S. aureus*, b. *V. harveyii* dan c. *P. aerogenosa**

c. Uji fisiologis dengan menggunakan Identification Strip (Kit Microgen)

Pengujian fisiologis dilakukan dalam dua metode berdasarkan hasil pewarnaan gram dari ke enam isolat terbaik. Isolat dengan gram negatif dilakukan dengan menggunakan *identification strip*

sedangkan untuk gram positif dilakukan dengan identifikasi parsial. Identifikasi dengan menggunakan *identification strip* ditentukan dengan adanya indikator positif terhadap kemampuan isolat dalam mendegradasi berbagai sumber karbon, nitrogen dan produk akhir hasil metabolisme. Pada bakteri gram positif, uji fisiologis diarahkan ke kelompok *Basillus* dengan melakukan uji parsial yang meliputi pewarnaan gram, endospora dan katalase. Isolat SAB E-8, SAB E-35 dan SAB E-40 dari hasil pewarnaan gram merupakan bakteri gram negatif. Hasil uji fisiologis dengan *identification strip* ditambah dengan uji oksidase dan motilitas menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut berasal dari genus

Pseudomonas. Uji parsial yang diarahkan ke kelompok *Basillus* dilakukan terhadap isolat SAB E-33, SAB E-38 dan SAB S-43 sebagai bakteri gram positif. Hasil uji parsial menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut adalah kelompok *Basillus*, dicirikan oleh sel yang berbentuk batang, pewarnaan gram positif, terdapat endospora yang terletak pada bagian sentral dan uji katalase positif. Indikator positif dan negatif dari uji fisiologis ini, didasarkan pada perubahan warna yang terjadi pada setiap uji setelah inkubasi selama 24 jam, perubahan warna tersebut. Hasil uji aktivitas fisiologis isolat-isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Fisiologis menggunakan *Identification strips* (Kit Microgen Bioproducts GN ID-AB)

isolat	GN ID-A												
	Ly	Orn	H2S	Glu	Man	Xyl	O.N.P.G	Indol	Urease	VP	Citrate	TDA	Nitrat
8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
35	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
40	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+

Ly: Lysine; Orn: Ornitin; H2S: Hidrogen sulfida; Glu: Glukosa; Man: manitol; Xyl: Xylose; O.N.P.G: ; Vp; Voges Proskouer; TDA:

isolat	GN ID-B												
	Gel	Mal	Inos	Sor	Rham	Suc	Lac	Ara	Ado	Raffi	Sal	Arginin 24	Arginin 48
8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
35	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
40	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-

Gel: Gelatin; Mal: Malonate; Inos: Inositol; Sor: Sorbitol; Rham: Rhamnose; Suc: Sucrose; Lac: Lactose; Ara: Arabinose; Ado: Addonitol; Raff: Raffinose; Sal: Salicin

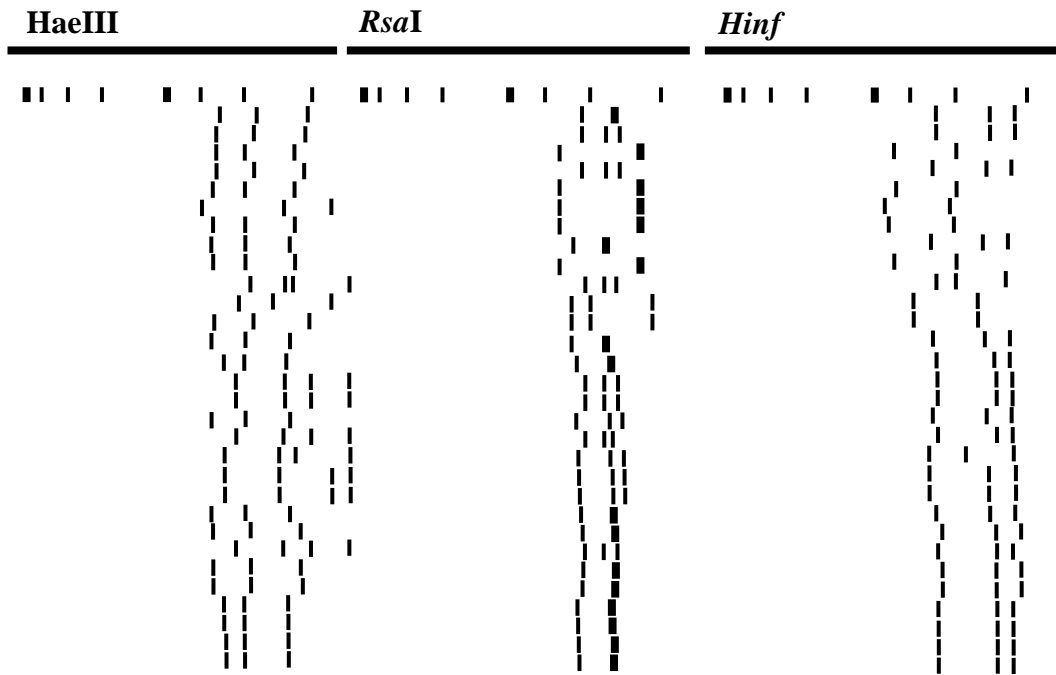
d. Amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)

Berdasarkan hasil uji antimikroba, diperoleh 30 isolat yang memiliki aktivitas antimikrob yang terdiri dari 24 isolat endofit dan 6 isolat yang berasal dari permukaan. Isolat yang terpilih akan digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar bakteri dengan metode ARDRA. Analisis phylogeni dari komunitas mikroba yang menggunakan ARDRA merupakan sebuah metode simpel yang didasarkan pada hasil pemotongan gen 16S rRNA. Hasil pemotongan gen 16S rRNA memperlihatkan pola pita gen 16S rRNA yang beragam dengan jumlah pita 2-4 (Gambar 3). Profil pita gen 16S rRNA yang beragam dihasilkan setelah didigesti dengan tiga enzim restriksi yaitu *RsaI*, *HaeII* dan *HinfI*. Ketiga enzim restriksi tersebut memiliki situs dan sifat pemotongan yang

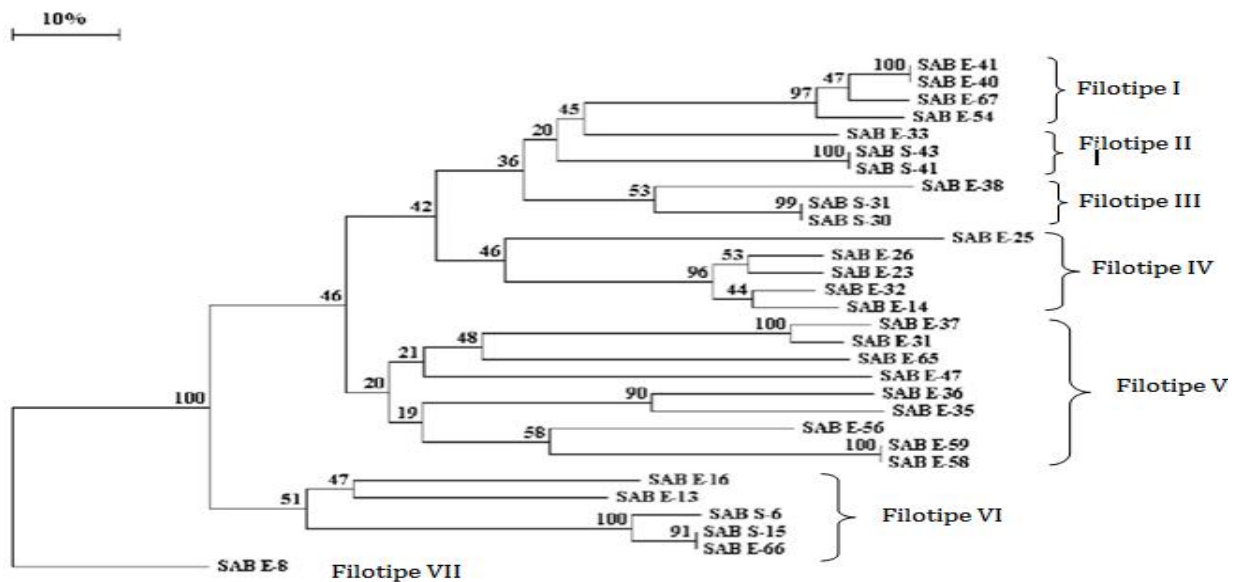
berbeda-beda. Pola hasil pemotongan gen 16S rRNA dapat dijadikan pustaka baku yang dapat digunakan sebagai referensi (Hall, *et al.* 2001).

Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan data Amplified rDNA restriction analysis mengelompokkan 30 isolat asal sponge *Jaspis* sp. yang memiliki aktivitas antimikrob menjadi tujuh filotipe (Gambar 4). Pengelompokan ini berdasarkan adanya kesamaan situs pemotongan tiap isolat setelah direstriksi oleh tiga enzim restriksi yang berbeda. Filotipe V merupakan kelompok yang terbesar karena terdiri atas sembilan isolat, sedangkan filotipe VII adalah kelompok yang terkecil karena hanya terdiri oleh satu isolat. Pada filotipe V tampak beberapa percabangan dengan nilai bootstrap diatas 60% dan dua diantaranya memiliki nilai bootstrap 100%. Hal ini menunjukkan bahwa di antara ke sembilan

isolat yang masuk ke dalam felotipe V memiliki keragaman genetik isolat bakteri yang memiliki situs pemotongan yang sama. Berdasarkan pohon aktivitas mikroba asal sponge *Jaspis* sp. filogenetik dengan ARDRA maka dapat diketahui



Gambar 3. Profil gen 16S rRNA yang dipotong dengan enzim restriksi HaeIII, RsaI dan HinfI



Gambar 4. Pohon filogenetik (*internode rooted*) hubungan kekerabatan antar isolat dengan aktivitas antimikrob asal *Jaspis* sp., dianalisis dengan ARDRA dan dikonstruksi berdasarkan metode neighbor joining. Angka 10% pada bagian atas pohon menunjukkan skala persentase perbedaan (*distance scale*) antar profil isolat bakteri. Angka pada nodus adalah nilai bootstrap dengan 100 replikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Castro, P. and M.E. Huber. 2005. Marine Biology. Fifth edition. The Mc Graw Hill Companies.
- Hall, V., P.R. Talbot, S.L. Stubbs, and B.I. Duerden. 2001. Identification of Clinical Isolates of Actinomyces Species by Amplified 16S Ribosomal DNA Restriction Analysis. J of clinic. microbiol: 3555–3562.
- Kim, T.K., A.K. Hewavitharana, P.N. Shaw, J.A. Fuerst. 2006. Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. Appl. Environ. Microbiol72:2118–2125.
- Marchesi, J.R. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacteria 16S rRNA. Appl. Environ Microbiol 64: 795-799.
- Miyashiro, Ikegami, S. 1994. Antibacillus substance in *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. Microbios78:7–16.
- Romanengko, L.A., T. Naoto, U. Masataka, I.K. Natalia, V.M. Valery. 2008. Diversity and antagonistic activity of sea ice bacteria isolated from the sea of Japan. Microbes Envirom.23(3):209-214.
- Sambrook, W. and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed ke-3. New York: Gold Spring Harbor Laboratory.
- van de Peer, Y. and R. de Wachter. 1994. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows Enviroment. Comput Appl Biosci 10: 569-570.
- Wahl M., P.R. Jensen and W. Fenical. 1994. Chemical control of bacterial epibiosis on Ascidians. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110:45–57.