

## **Karakterisasi Fisiologi dan Molekuler Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA dari Bromo Kabupaten Probolinggo**

### *Characterization Physiology and Molecular Bacteria Symbiont-Entomopathogenic Nematodes Based of Gene Sequences Encoding the 16S rRNA District Of Bromo Probolinggo*

Bagus Setiawan<sup>1\*</sup>, Didik Sulistyanto<sup>2</sup>, Kartika Senjarini<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Masters of Science Biology, Jember University, Jember University,*

<sup>2</sup>*Faculty of Agriculture, Jember University,*

<sup>3</sup>*Biology Department, Jember University*

\*Email: gstemha@gmail.com

#### **ABSTRACT**

This study aims to identify entomopathogenic nematodes symbiotic bacteria phenotypically and based on the gene encoding 16S rRNA sequences. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes, obtained from isolates from the area Wonokerto (WN01) and isolates Sukapura (SP01), Bromo, Probolinggo, two symbiont bacteria was found in entomopathogenic nematodes *Steinernema* sp. The method used in this study are: the isolation of entomopathogenic nematodes *Steinernema* sp. and bacterial symbionts conventionally for the identification of phenotypically, after the characterization of bacterial isolates, the isolation of genomic DNA, 16S rRNA PCR, DNA purification and DNA sequence analysis. The results based on phenotypic characterization showed that isolates WN01 and SP01, yellowish white, gram positive, negative bioluminescence, catalase positive, can not hydrolyze urea, and also can not produce H<sub>2</sub>S. The results of the gene encoding 16S rRNA sequence can be deduced WN01 isolates have in common with the bacteria *Bacillus* strain *toyonensis* BCT 7112, while the SP01 isolates have in common with the bacteria *Bacillus* strain *cereus* ATCC 14 579.

**Keywords** : Bacterial symbionts-entomopathogenic nematodes, physiological characterization, *Bacillus* strain *toyonensis* BCT7112, *Bacillus cereus* ATCC 14579

#### **PENDAHULUAN**

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan metode konvensional dan molekuler. Metode konvensional dapat dilakukan berdasarkan pada karakteristik fenotip yaitu pewarnaan Gram, morfologi dan reaksi biokimia. Namun, metode identifikasi bakteri secara konvensional ini memiliki beberapa kelemahan. Metoda ini tidak dapat digunakan untuk organisme yang belum teridentifikasi. Lebih lanjut, kita kadang-kadang dihadapkan dengan organisme yang menunjukkan karakteristik biokimia yang tidak cocok dengan pola setiap genus dan spesies yang dikenal. Sementara itu, identifikasi organisme yang ketika dikultur tumbuhnya lambat menjadi sangat sulit (Woo, 2003). Karakter fisik dan biokimiawi merupakan karakter yang tidak statis dan berubah karena adanya stress dan evolusi, maka hal ini juga

mempengaruhi hasil identifikasi (Ochman, 2005).

Sejak penemuan Polymerase Chain Reaction dan sekuensing DNA, perbandingan urutan gen dari spesies bakteri menunjukkan bahwa gen 16S rDNA sangat kekal dalam suatu spesies dan antar spesies dengan genus yang sama, dan dapat digunakan sebagai teknik baru untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies (Oleson, 1993). 16S subunit kecil ribosom DNA (rDNA) adalah molekul yang saat ini menjadi pilihan untuk mengidentifikasi bakteri dan mikroorganisme lainnya di tingkat spesies. Identifikasi berbasis rDNA bersifat akurat untuk sampai tingkat spesies karena urutan 16S rDNA yang memiliki kesamaan  $\geq 99\%$  dari sekuen yang ada di GenBank. Identifikasi pada tingkat genus dapat dilakukan apabila urutan sekuen 16S rDNA memiliki kesamaan  $\geq 97\%$  dengan sekuen yang ada di GenBank. Kegagalan dalam mengidentifikasi

dimungkinkan apabila sekuen 16S rDNA memiliki homologi lebih rendah dari 97% dibandingkan sekuen yang ada di GenBank pada saat analisis. Lebih jauh lagi fleksibilitas yang luar biasa membuatnya sangat berarti dalam hal skrining dan identifikasi mikroorganisme.

## METODE

### Isolasi nematoda *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp entomopatogen bakteri symbion pada *Galleria mellonella*

Isolasi nematoda entomopatogen dilakukan dengan metoda White trap. Serangga yang digunakan sebagai umpan adalah Greater wax moth larva *Galleria mellonella*. Perbanyak nematoda juga dilakukan secara in vivo dalam tubuh larva *G. mellonella* (Poinar, 1979; Woodring, 1988). Dan didapatkan juvenil infeksi (ji) sebanyak 1 ml dengan konsentrasi 200 ji/ml dimasukkan ke dalam cawan petri (diameter 20 cm) yang telah dilapisi dengan dua lapis kertas saring Whatman No. 1. Selanjutnya 40 larva instar akhir *G. mellonella* dimasukkan ke dalam cawan petri tersebut dan diinkubasi di tempat gelap selama 48 jam. Larva-larva yang mati diletakkan pada cawan petri yang telah berisi kertas tisu lembab, kemudian dimasukkan pada sebuah kotak plastik berukuran lebih besar dari diameter cawan petri. Kotak plastik ini diisi dengan larutan formalin 0,1% setinggi setengah tinggi cawan petri. Setelah 5-6 hari maka juvenil infeksi akan terperangkap dalam air dan siap untuk dipanen.

### Karakterisasi isolat bakteri

Isolasi dilakukan dengan media Nutrient Bromthymol Blue Triphenyltetrazolium Chloride Agar (NBTA) untuk mendapatkan koloni yang mampu menyerap bromthymol blue sehingga koloni berwarna biru. Koloni bakteri fase primer tersebut kemudian diperbanyak untuk dijadikan sumber inokulum. Inokulum diperbanyak pada media NB (Nutrient Broth) cair yang diinkubasi selama 24 jam suhu ruangan (27°C) (Sulistiyanto, 1999).

Karakterisasi selanjutnya yang dilakukan yaitu melihat warna satu ose isolat bakteri dari stok kultur/inokulum pada gelas obyek dan ditambahkan 1 tetes kristal violet, 1 tetes Gram's iodine mordant (Emerck), etil alkohol 95% sampai kristal violet tidak larut lagi dan safranin kemudian dikeringkan dan diperiksa dengan mikroskop. Bioluminescence ditentukan dengan mengamati kultur bakteri pada media NA berusia 48 jam selama 10 menit dalam kegelapan total. Pengujian katalase, diambil sedikit biakan bakteri dengan menggunakan jarum ose. Disuspensikan biakan tersebut pada setetes larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pada gelas objek dan diamati adanya gelembung. Tes urease dilakukan dengan menginokulasi bakteri resisten ke media padat urea Christensen, tes positif ditandai dengan terbentuknya warna merah. Tes produksi H<sub>2</sub>S dilakukan dengan

meninokulasi bakteri resisten ke media SIM (pepton 30 g/L, ekstrak daging 3 g/L, ferroamonium sulfat 0,2 g/L dan natrium tiosulfat 0,025 g/L, agar 3 g/L). Tes positif ditandai dengan terbentuknya endapan hitam.

### PCR DNA pengkode 16S rRNA

Isolat bakteri yang terlihat pita DNA genomnya diamplifikasi dengan menggunakan primer DNA pengkode 16S rRNA yaitu 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'), 533F (5' GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3'), dan 907R (5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3'), 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Lane, 1991).

### Analisis Sekuen DNA pengkode 16S rDNA

Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR ke Macrogen Korea. Bioedit software digunakan untuk analisis data kasar hasil sekuensing (Tom Hall, Ibis Therapeutics). Setelah diketahui alignment sekuen DNA pengkode 16S rRNA dari masing-masing isolat maka sekuennya dibandingkan dengan database gen 16S rDNA menggunakan BLAST online software, untuk menentukan spesies dari isolat dan hubungan kekerabatan dengan spesies bakteri lainnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

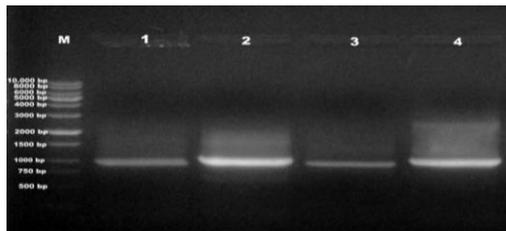
Determinasi dari isolat bakteri dilakukan dengan melakukan serangkaian pengujian sifat fisiologis dan morfologi yang meliputi sifat karakterisasi isolat bakteri WN01 dan SP01 didapatkan hasil bahwa isolat WN01 dan SP01 berwarna putih kekuningan, keduanya Gram positif, Bioluminescence negatif, katalase positif, tidak dapat menghidrolisis urea, dan juga tidak dapat memproduksi H<sub>2</sub>S. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji fisiologi dan morfologi isolat Wonokerto (WN01) dan isolat bakteri Sukapura (SP01).

Uji fisiologi dan morfologi	Isolat WN01 (Wonokerto)	Isolat SP01 (Sukapura)
Warna koloni bakteri	Putih kekuningan	Putih kekuningan
Gram	+	+
Bioluminescence	-	-
Katalase	+	+
Hidrolisis urea	-	-
Produksi H <sub>2</sub> S	-	-

Keterangan : (+): positif; (-): negatif

Hasil amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA pada gambar 1 menunjukkan bahwa pita DNA hasil PCR pada pasangan primer 27F dan 907R tampak sejajar dengan pita DNA marker yang berukuran 900 bp, dan relevan dengan hasil yang diharapkan yang terlihat pada fragmen DNA berukuran 880 bp, sedangkan pada pita DNA pasangan 533F dan 1492R berada pada kisaran 1.000 bp, dan hasil ini sesuai dengan ukuran hasil PCR menggunakan pasangan primer tersebut yaitu pada 959 bp. Hasil dari visualisasi elektroforesis tampak seluruh produk PCR yang didapatkan merupakan pita tunggal, yang mengindikasikan bahwa kedua pasangan primer tersebut berhasil mengamplifikasi secara spesifik fragmen DNA pada isolat bakteri WN01 dan SP01 yang diharapkan, yaitu M: Marker 1 kb; nomor 1 dan nomor 2: Bakteri Symbion WN01 27F-907R,533F-1492R; nomor 3 dan nomor 4: Bakteri Symbion SP01 27F-907R ,533F-1492R.



M: Marker 1 kb DNA ladder; Sumur 1 dan 2: Bakteri Symbion WN01 27F-907R,533F-1492R; Sumur 3 dan 4: Bakteri Symbion SP01 27F-907R ,533F-1492R.

Gambar 1. Hasil elektroforesis dari amplifikasi gen 16S rRNA isolat bakteri WN01 dan SP01.

Bakteri *B. cereus* adalah salah satu agensia patogen yg mempunyai potensi besar untuk digunakan sebagai pengendali hayati. Bakteri ini mempunyai inang yg spesifik, tidak berbahaya bagi musuh alami hama dan organisme non target lainnya, mudah terbiodegradasi oleh lingkungan serta dapat dinaikkan patogenitasnya dengan teknik rekayasa genetika (Khetan, 2001). Beberapa strain *B. cereus* yang patogenik telah dikembangkan untuk mengendalikan serangga hama diantaranya strain Pr 1017 yang diisolasi dari larva *Pristiphora erichsonii* yang sakit (Heimpel dan Angus, 1963), sedangkan *Bacillus toyonensis* strain BCT-7112 mempunyai sifat fisiologi motil, anaerob fakultatif, dan tipe sel single, koloni biasanya lebar, datar dengan seluruh tepi bergelombang

(undulate), dan sering membentuk cincin disekeliling koloni meluas keluar plate. Biasanya, koloni granulate, berwarna putih sampai krim. Suhu pertumbuhannya berkisar antara 10-45°C, dapat tumbuh optimum pada suhu 35°C. Memiliki kedekatan terdekat dengan kelompok bakteri *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Jiménez, 2013).

## KESIMPULAN

Isolat WN01 dan SP01 memiliki bentuk sel basil dan Gram positif, berwarna putih kekuningan, keduanya Gram positif, Bioluminescence negatif, katalase positif, tidak dapat menghidrolisis urea, dan juga tidak dapat memproduksi H<sub>2</sub>S, dan dari hasil karakterisasi secara fisiologi dilanjutkan berdasarkan hasil analisis DNA pengkode 16S rRNA, isolat bakteri WN01 merupakan bakteri jenis *Bacillus toyonensis* strain BCT 7112 sedangkan isolat bakteri SP01 merupakan bakteri *Bacillus cereus* ATCC 14579 dengan presentase kemiripan 98%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Heimpel. AM. and A.I Angus. 1963. *Disease Caused by Certain Sporeforming Bacteria*. In E.A. Steinhous (Eds) *Insect Pathology and Advanced Trastise*. Vol. (2); Academic Press, New York.
- Jiménez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, Kämpfer P, Kolstø AB, Ramón D, Martínez JF, Codoñer FM, Rosselló-Móra R. 2013. *Description of Bacillus toyonensis sp. nov., a novel species of the Bacillus cereus group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations*. Syst Appl Microbiol. 2013 Sep;36. Vol. (6): 383-91. Epub 2013 Jun 19
- Khetan, S.K. 2001. *Microbial Pest Control*. [http://www.cplbookshop.com/contents/C15\\_5.htm](http://www.cplbookshop.com/contents/C15_5.htm) [diakses 17 September 2015]
- Ochman, H. and S. R. Santos. 2005. *Exploring microbial microevolution with microarrays*. Infection, Genetics and Evolution. Vol. (5): 103–108.
- Olsen, G. J. & Woese, C. R. 1993. *Ribosomal RNA: a key to phylogeny*. FASEB J. Vol. (7): 113-123.

- Poinar, G.O. 1990. *Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae*. Entomopathogenic Nematodes in biological Control of Insect. Boca Raton. Florida: CRC Press.
- Sulistiyanto, D. 1999. *Nematoda Entomopatogen, Steinernema sp. dan Heterorhabditis sp. Isolat Lokal sebagai Pengendali Hayati Serangga Hama Perkebunan*. Makalah Lustrum Universitas Jember, 2 Desember 1999. Jember: 12.
- Woodring, J.L. and Kaya. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes*. A Handbook of Technique.. Fayatvile. Arkansas: Arkansas Agric.Expt. Stst.
- Woo Patrick C. Y., Ng Kenneth H. L., Lau Susanna K. P., Yip Kam-tong, Fung Ami M. Y., Leung Kit-wah, Tam Dorothy M. W., Que Tak-lun, dan Yuen Kwok-yung. 2003. *Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles*. Journal of Clinical Microbiology. Vol. (5): 41.