



**IDENTIFIKASI BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN  
ISOLAT LOKAL ASAL BROMO JAWA TIMUR BERDASARKAN  
SEKUEN DNA PENGKODE 16S rRNA**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

oleh

**Washilul Arham  
NIM. 101810401009**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua, yang telah mendidik sedari kecil dengan penuh kasih sayang, dan juga do'a yang terus mengalir mengiringi perjalanan hidup saya;
2. semua keluarga besar, dan teman-teman yang telah mendukung dan memberi motivasi dalam melanjutkan pendidikan sampai saat ini;
3. semua guru dari taman kanak-kanak, pesantren, hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan mengajari saya, terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran memberikan ilmu pengetahuan;
4. almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

“Maha Suci Engkau, tidak ada yang kami ketahui selain dari apa yang telah Engkau ajarkan kepada kami, sesungguhnya Engkaulah Yang Maha Mengetahui lagi Maha Bijaksana”  
(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 32)<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup>Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an Cordoba Al-Qur'san Tajwid dan Terjemaahannya (Al-Qur'an Tafsir Bil Hadis)*. Bandung: Cordoba International-Indonesia.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Washilul Arham

NIM : 101810401009

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Identifikasi Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA*” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian yang berjudul “Pengembangan Wilayah serta Produksi Holtikultura Organik di Bromo Jawa Timur untuk Pangan Organik Nasional” dan dibiayai program DP2M DIKTI KEMENDIKBUD atas nama Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 April 2015

Yang menyatakan,

Washilul Arham  
NIM. 101810401009

**SKRIPSI**

**IDENTIFIKASI BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN  
ISOLAT LOKAL ASAL BROMO JAWA TIMUR BERDASARKAN  
SEKUEN DNA PENGKODE 16S rRNA**

Oleh

Washilul Arham  
NIM. 101810401009

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama :Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota :Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto. M.P

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Identifikasi Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Dr.rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si  
NIP 197509132000032001

Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto. M.P  
NIP 196403231988031002

Anggota I,

Anggota II,

Purwatiningsih, M.Si., Ph.D  
NIP 197505052000032001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes  
NIP 196008161989021001

Mengesahkan  
Dekan,

Prof. Drs. Kusno DEA., Ph.D  
NIP 196101081986021001

**RINGKASAN**

**Identifikasi Bakteri Simbion-Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S Rrna;** Washilul Arham, 101810401009; 2015: 44 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Nematoda dari genus *Steinernema* (Rhabditida: *Steinernematidae*) dan Heterorhabditis (Rhabditida: *Heterorhabditidae*) bersifat patogenik terhadap serangga sehingga menjadi jasad pengendali hayati yang prospektif. Di Indonesia NEP lokal telah banyak diisolasi dari tanah dengan cara menggunakan umpan larva seangga *Galleria melonella*, dan diketahui efektif terhadap berbagai serangga hama di rumah kaca ataupun lapangan.

NEP mampu membunuh serangga inang dikarenakan adanya peran penting bakteri simbion yang ada di dalam saluran pencernaannya. NEP masuk ke dalam haemocoel inang, dan melepaskan bakteri simbion. Bakteri simbion berkembang biak di dalam haemolimph (cairan darah dalam haemocoel serangga), mengeluarkan senyawa entomotoksin yang menyebabkan kematian serangga. Identifikasi bakteri simbion-NEP isolat lokal berdasarkan molekuler masih belum dilakukan, oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengidentifikasi jenis bakteri simbion-NEP isolat lokal berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA.

Sebanyak empat isolat bakteri simbion-NEP koleksi Laboratorium HPT Fakultas Pertanian Universitas Jember dari daerah Bromo Cemorolawang (CL01), Ngadas (NG01), Sapikerep (SK01), dan bakteri simbion-NEP *Heterorhabditis bacteriophora* (HB01) digunakan sebagai sampel. Metode yang digunakan antara lain 1) isolasi bakteri simbion, 2) isolasi DNA genom, 3) BOX PCR, 4) PCR 16S rRNA, 5) pemurnian DNA dan 6) analisis sekuen DNA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat-isolat bakteri simbiosis-NEP isolat lokal asal Bromo Jawa Timur terdapat diversitas genetik berdasarkan BOX PCR. Sedangkan hasil analisis sekuen gen pengkode 16S rRNA menunjukkan bahwa dua sekuen isolat CL01 dan SK01 merupakan bakteri simbiosis *Providencia vermicola* yang bersimbiosis dengan NEP jenis *Steinernema thermophilum* dengan presentase kemiripan 99%.





## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul: “*Identifikasi Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih kepada:

1. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., dan Prof. Dr. Ir. Didik Sulistyanto, M.P., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, saran dan motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Purwatiningsih, M.Si., Ph.D., dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes., selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama masa perkuliahan;
4. bapak dan ibu dosen, serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala keikhlasan hati berbagi ilmu dan membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. ayahanda Miskan, Ibunda Musfirotul Hijriyah, adik Qismatul Badi'iyah, Afifatun Nadhiroh, Nuzhatun Nafsi, nenek Lailiyah dan alm. kakek Syaifullah, keluarga besar kakek Ghozali Maskie, paman Fadlil Lathief, dan seluruh keluarga tercinta yang telah memberikan ketenangan, kasih sayang dan juga do'a yang tiada henti-hentinya;
6. sahabat-sahabatku Desta, Aji, Shandi, Tarigan, Ahmil, dan Firda yang selama ini telah memberikan semangat, teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2010, serta

kalongers, keluarga istana presiden, kapak, terima kasih atas kebersamaan, persaudaraan, dan tempat berbagi suka dan duka;

7. rekan kerja seperjuangan Renam, Elisa, Mirza, Ajeng, Novanda, pak Sugeng, pak Gora, bu Yanti, bu Titin dan pak Mahful, teman-teman lab mikro dan Biomol tumbuhan terima kasih atas kerja sama, dukungan serta bantuan yang diberikan selama penelitian;
8. kakak-kakak seperjuangan mbak Esti, mbak Riskha, mas Wathon, mas Imam, mbak Ika, mas Arif, mbak Madaniyah, mbak Dewi, mbak Rofi'atul, pak Ali, dan adik-adik seperjuangan Zakiya, Dewi, Bella, Izzay, Amatullah dan Suci yang selalu memberikan dukungan dan semangatnya;
9. staf, peneliti dan teknisi Lab. Biologi Dasar, Mikrobiologi FMIPA serta lab Hama dan Penyakit Tanaman FAPERTA Universitas Jember yang telah meluangkan waktu dan tenaganya dalam mendukung lancarnya proses penelitian;
10. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga bimbingan dan semangat yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis sangat mengharapkan masukan yang bersifat kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua,

Jember, April 2015

Penulis

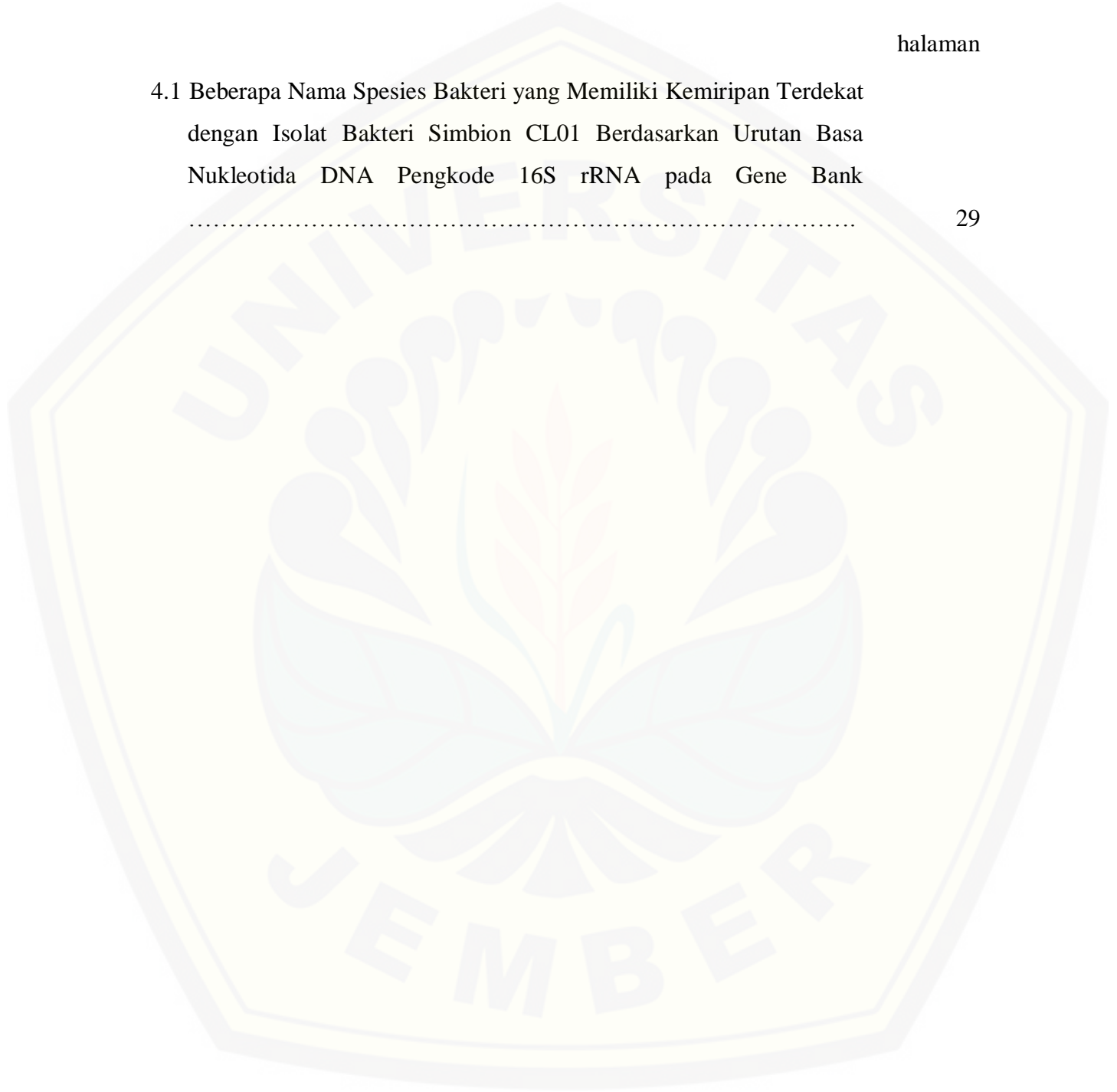
DAFTAR ISI

	<b>halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA .....	ix
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Asosiasi Bakteri Simbion dengan Nematoda         Entomopatogen.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 16S rRNA PCR sebagai Basis Identifikasi secara         Molekuler dan Penentuan Pohon Filogeni .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Sekuensing (Penentuan Urutan Basa Nukleotida).....</b>	<b>13</b>

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.1 Isolasi Bakteri Simbion.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.2 Isolasi DNA Genom .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.3 BOX PCR untuk Melihat Profil Genom Bakteri .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.4 PCR DNA Pengkode 16S rRNA .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.5 Purifikasi DNA Hasil PCR .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.6 Analisis Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA .....</b>	<b>21</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Kekerabatan Isolat Lokal Bakteri Simbion-NEP berdasarkan Sekuen DNA Pengkode BOX A1R.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 <i>Providencia vermicola</i>, Bakteri Simbion-NEP Isolat Lokal Cemorolawang dan Sapi Kerep.....</b>	<b>26</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>39</b>

**DAFTAR TABEL**

	halaman
4.1 Beberapa Nama Spesies Bakteri yang Memiliki Kemiripan Terdekat dengan Isolat Bakteri Simbion CL01 Berdasarkan Urutan Basa Nukleotida DNA Pengkode 16S rRNA pada Gene Bank .....	29



**DAFTAR GAMBAR**

	halaman
2.1 A) Lokasi Bakteri Symbion.; (B) Siklus Hidup Nematoda .....	5
2.2 Ilustrasi Amplifikasi PCR .....	9
2.3 Ribosom pada Prokariot .....	11
2.4 Perbandingan Struktur Sekunder 16S rRNA Beberapa Eubakteria pada Posisi Basa 179 sampai 220.....	12
2.5 Prinsip Sekuensing Sanger dengan Pewarnaan Fluoresen pada ddNTP.....	16
4.1 (A) Larva terinfeksi NEP <i>Steinernema sp.</i> (B) Larva terinfeksi NEP <i>Heterorhabditis sp.</i> .....	22
4.2 (A) Media NANR steril (B) Isolat bakteri symbion-NEP pada media NANR .....	23
4.3 Visualisasi Hasil Isolasi DNA Genom Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo .....	24
4.4 Profil Genom Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo berdasarkan BOX PCR .....	25
4.5 Pohon filogeni bakteri symbion berdasarkan pola migrasi hasil BOX PCR menggunakan Clad97.....	25
4.6 Posisi dua Pasang Primer Mengamplifikasi Gene 16S rRNA untuk Memperoleh Sekuen Utuh .....	26
4.7 Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Pengkode 16S rRNA Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo .....	27
4.8 Visualisasi Hasil Purifikasi DNA Pengkode 16S rRNA Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo.....	28
4.9 Pohon Filogeni kedekatan antara isolat bakteri symbion CL01 dengan isolat bakteri yang terdapat di Gene Bank BLAST NCBI.....	30

**DAFTAR LAMPIRAN**

	halaman
A. Komposisi Media dan Larutan .....	39
B. Sekuen 16S rRNA Utuh Isolat Bakteri Symbion-NEP Lokal Asal Bromo Jawa Timur menggunakan Primer 27F, 907R, 533F dan 1492R.....	40
C. Pensejajaran sekuen 16S rRNA Isolat CL01 dan SK01 dengan sekuen 16S rRNA Utuh <i>Providencia vermicola</i> Pada Gene Bank .....	43

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Hama serangga merupakan masalah besar bagi para petani. Akibat dari serangan hama serangga, tanaman menjadi rusak, hasil produksi pertanian menurun dan akhirnya dapat menimbulkan kerugian ekonomis yang tinggi (Safitri *et al.*, 2013). Untuk mengatasi permasalahan ini, petani menggunakan insektisida sintetis dalam pengendalian hama serangga. Insektisida sintetis, meskipun efektif tetapi juga memiliki dampak negatif, khususnya pada lingkungan, seperti timbulnya resistensi, resurgensi, serta berdampak negatif terhadap organisme bukan sasaran (Arifin, 2011). Oleh karena itu, saat ini telah banyak dikembangkan pengendalian hama yang ramah lingkungan menggunakan bioinsektisida berbahan aktif nematoda entomopatogen (NEP) yang aman bagi manusia, tidak mengganggu kehidupan fauna bukan sasaran dalam tanah, dan tidak meninggalkan residu bahan kimia sintetis pada lingkungan maupun pada produk hasil pertanian (Nugrohorini, 2009).

NEP mampu membunuh serangga inang dikarenakan adanya peran penting bakteri simbiosis yang ada di dalam saluran pencernaannya. NEP aktif mencari inang, masuk ke dalam tubuh serangga inang melalui lubang alami seperti mulut, anus, trakea, spirakel atau langsung menembus kutikula (Simoes dan Rossa, 1996). Setelah masuk ke dalam tubuh, NEP masuk ke dalam haemocoel inang, dan melepaskan bakteri simbiosis. Bakteri simbiosis berkembang biak di dalam haemolimph (cairan darah dalam haemocoel serangga), mengeluarkan senyawa entomotoksin yang menyebabkan kematian serangga (Boemare *et al.*, 1996). Di Indonesia NEP lokal telah banyak diisolasi dari tanah dengan cara menggunakan umpan larva serangga *Galleria melonella* (Chaerani *et al.*, 2007).

Dalam pengendalian biologi hama serangga yang menggunakan agen NEP, hubungan mutualistik antara NEP dan bakteri simbiosis merupakan hal penting yang



mendasar untuk diketahui (Liu *et al.*, 2001), sehingga identifikasi jenis bakteri simbion yang berada dalam NEP juga merupakan hal yang diperlukan sebagai langkah lanjutan khususnya untuk mengetahui mekanisme kerja entomotoksinya sekaligus karakterisasi senyawa tersebut untuk bisa diterapkan sebagai entomotoksin organik.

Identifikasi bakteri simbion NEP secara biokimia telah dilakukan oleh Muchlisin dan Ekowati pada tahun 2001. Dari hasil penelitiannya disebutkan bahwa bakteri simbion-NEP isolat lokal dari Ngadas, Sumberejo, Panti, dan Ijen adalah *Photorhabdus luminiscens*. dengan karakteristik fisiologi yaitu Gram (-), menghasilkan antibiotik, bioluminiscens positif, bersifat oksidatif fermentatif dan tumbuh pada suhu optimal 25<sup>0</sup>C (Muchlisin, 2001). Sedangkan bakteri simbion-NEP isolat lokal *Steinernema* sp. (dari Jember, Bondowoso, Probolinggo, dan Malang) merupakan isolat bakteri yang memiliki karakteristik fisiologi Gram (-), menghasilkan antibiotik, dan bioluminiscens negatif (Ekowati, 2001).

Namun demikian, identifikasi bakteri berdasarkan karakter fenotip maupun biokimia telah diketahui memiliki kelemahan, yaitu kerap terjadi perbedaan dalam pembacaan hasil identifikasi. Selain itu karakter fenotip yang sama belum tentu menunjukkan jenis bakteri yang sama. Begitu juga karakter biokimia yang merupakan karakter yang dapat berubah oleh adanya stress akibat pengaruh lingkungan (tidak statis) (Ochman *et al.*, 2005). Saat ini identifikasi secara molekuler dengan membandingkan sekuen gen 16S rRNA telah terbukti sangat berguna dan akurat dalam menentukan jenis bakteri, begitu juga untuk menentukan hubungan kekerabatan bakteri dalam pohon filogeni (Liu *et al.*, 1997). Selain lebih akurat, identifikasi secara molekuler juga dinilai lebih cepat (Suryanto, 2003). Oleh karena itu, identifikasi jenis bakteri simbion-NEP isolat lokal berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA merupakan langkah yang penting untuk melakukan karakterisasi yang lebih akurat terhadap jenis bakteri simbion-NEP isolat lokal.

## 1.2. Rumusan Masalah

Serangga yang mati akibat infeksi NEP dikarenakan adanya peran bakteri simbion. NEP lokal telah berhasil dikoleksi dari tanah pertanian Bromo Jawa Timur begitu juga bakteri simbion telah dilakukan isolasi, hanya saja bakteri tersebut belum dikarakterisasi secara molekuler. Pengetahuan molekuler terkait dengan identitas bakteri merupakan hal penting untuk langkah karakterisasi bioentomotoksin dalam pengembangan pertanian organik.

## 1.3 Batasan Masalah

Identifikasi molekuler dilakukan berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA menggunakan sampel bakteri simbion-NEP lokal asal tanah pertanian Bromo koleksi laboratorium HPT Fakultas Pertanian Universitas Jember. Bakteri teridentifikasi kemudian dilihat hubungan filogenetiknya, yaitu dengan mencocokkan dengan sekuen DNA pengkode 16S rRNA bakteri pada *Gene Bank*.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri simbion-NEP isolat lokal asal Bromo Jawa Timur berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA serta mengetahui hubungan filogenetiknya.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Data yang diperoleh dapat memberikan informasi mengenai identitas bakteri simbion-NEP isolat lokal asal Bromo Jawa Timur dan hubungan filogenetiknya berdasarkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

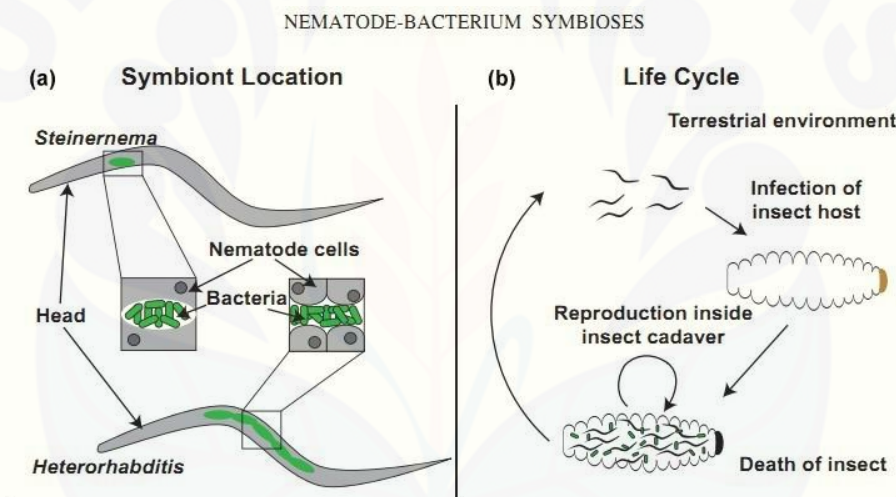
### 2.1 Asosiasi Bakteri Symbion dengan Nematoda Entomopatogen (NEP)

Nematoda dari genus *Steinernema* (Rhabditida: *Steinernematidae*) dan *Heterorhabditis* (Rhabditida: *Heterorhabditidae*) bersifat patogenik terhadap serangga sehingga menjadi jasad pengendali hayati yang prospektif (Kaya & Gaugler, 1993). Nematoda entomopatogen (NEP) dari Famili *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* banyak digunakan dalam pengendalian biologi hama serangga pertanian (Boemare *et al.*, 1997). Kompleks nematoda-bakteri ini merupakan pengendali hayati serangga yang aman terhadap organisme bukan sasaran dan telah digunakan secara komersial untuk mengendalikan serangga-serangga hama di Eropa dan Amerika Serikat (Ehlers, 1996). Di Indonesia NEP lokal telah banyak diisolasi dari tanah dengan cara menggunakan umpan larva serangga *Galleria melonella* (Chaerani *et al.*, 2007) dan diketahui efektif terhadap berbagai serangga hama di rumah kaca ataupun lapangan, antara lain terhadap kompleks penggerek batang padi (Chaerani dan Nurbaeti, 2006, 2007), hama lanas, ubi jalar (Chaerani dan Waluyo, 2006).

Serangga yang mati akibat infeksi NEP dikarenakan adanya peran penting bakteri symbion yang ada di dalam saluran pencernaannya. NEP masuk ke dalam tubuh serangga inang melalui lubang alami seperti mulut, anus, trakea, spirakel atau langsung menembus kutikula (Simoes dan Rossa, 1996). Kemudian nematoda menembus dinding haemocoel dan melepas bakteri symbion kedalam haemoliph inang. Bakteri symbion berkembangbiak dengan cepat di dalam haemoliph inang dan membunuh inang dalam waktu 24-48 jam dengan cara septikemia (meracuni darah), akibat metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh bakteri yang bersifat toksik (Gaugler, 2002). Selain itu juga terjadi biokonversi bangkai inang menjadi nutrisi yang ideal untuk pertumbuhan dan reproduksi nematoda. Nematoda bereproduksi

sampai suplai nutrisi mulai habis, berkembang menjadi stadium infeksi juvenil dan berkoloni kembali dengan bakteri simbiosis lalu keluar dari bangkai inang untuk mencari inang baru (Forst dan Neelson, 1996). Dalam satu tubuh inang serangga, nematoda dapat berkembang biak dua sampai tiga generasi (satu generasi berlangsung 10-14 hari) (Woording dan Kaya, 1988).

Bakteri simbiosis yang berasosiasi dengan nematoda famili *Heterorhabdidae* berada di midgut dari saluran pencernaan (usus) nematoda, dan bakteri simbiosis yang berasosiasi dengan nematoda famili *Steinernematidae* berada di vesikel khusus saluran pencernaan nematoda (Blaxter *et al.*, 1998), seperti pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 (a) Lokasi bakteri simbiosis pada saluran pencernaan NEP (b) Siklus hidup Nematoda-Bakteri simbiosis (Sumber: Murfin *et al.*, 2012)

*Xenorhabdus* dan *Photorhabdus* merupakan jenis bakteri yang bersimbiosis secara spesifik dengan NEP dari famili *Steinernematidae* atau *Heterorhabdidae*, secara berurutan (Forst dan Neelson, 1996). Bakteri ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae, motil, Gram negatif, akan tetapi keduanya tidak dapat mereduksi nitrat, hanya memfermentasi sedikit dari karbohidrat.

Aspek yang menarik dari kedua jenis bakteri ini adalah variasi fenotip sel yang tumbuh ketika masa inkubasi diperpanjang. Variasi yang dimaksud adalah

bakteri memiliki fase sel sekunder yakni fase sel yang telah berubah sifatnya dari fase sel primer (baru diisolasi langsung dari nematoda). Keunikan lain dari siklus hidup *Photorhabdus* dan *Xenorhabdus* adalah bersimbiosis mutualistik dengan satu nematoda, akan tetapi patogenitasnya menyerang berbagai macam inang larva serangga. Bakteri mendapatkan keuntungan dari interaksi ini berupa perlindungan dari kompetitor didalam lingkungan tanah, selain itu bakteri mendapatkan sarana transportasi menuju haemolimp serangga yang kaya akan nutrisi. Disisi yang lain bakteri membantu nematoda membunuh serangga dengan potensi patogenik yang dimilikinya, bakteri juga menyediakan sumber nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan nematoda, dan juga menekan kontaminasi bangkai inang dari mikroorganisme tanah lain (Gaugler, 2001).

Siklus hidup masing-masing kompleks antara bakteri-nematoda nampak sama, namun dengan penyorotan lebih dekat perbedaan antara *Heterorhabditis-Photorhabdus* dan *Steinernema-Xenorhabdus* dapat lebih dibedakan. *Photorhabdus luminencens* dan *Xenorhabdus nematophila* merupakan spesies yang secara ekstensif banyak dipelajari mewakili genus *Photorhabdus* dan *Xenorhabdus*. Perbedaan dari mayoritas karakter fenotip bakteri tersebut menampakkan perbedaan yang penting. *P. luminencens* memiliki aktivitas katalase, bioluminescent positif, memproduksi antibiotik hidrosistilben dan pigmen warna anthraquinon. Kristalin protoplasmik terdiri dari 11.6 kDa (CipA) atau 11.3 kDa (CipB) (kristal protein). Secara garis besar, tetapi tidak semua strain *P. luminencens* memiliki aktivitas urease, memproduksi indol dan mampu menghidrolase aeskulin. Berbeda dengan *X. nematophila*, pada bakteri ini tidak ditemukan aktivitas katalase, bakteri ini memproduksi bahan antimikroba (xenocoumacins, xenorhabdins, beberapa derivat indol), tidak memiliki pigmen warna dan memproduksi kristalin protoplasmik dari komponen 26 kDa atau 22 kDa kristal protein. *X. nematophila* tidak memiliki aktivitas urease, produksi indol atau hidrolase aeskulin (Boemare dan Akhurst, 1988).

Sebagian besar bakteri simbiosis-nematoda memiliki virulensi yang tinggi ketika diinjeksi secara langsung ke tubuh larva serangga. ini terbukti jelas bakteri

berhasil berkembangbiak dalam tubuh serangga dengan menekan respon imunnya. beberapa spesies bakteri simbiosis tidak toksik ketika diinjeksikan secara langsung akan tetapi mereka bersifat toksik ketika menginfeksi bersama dengan masing-masing vektornya (nematoda) (Gaugler, 2001). Disini tampak bahwa masing-masing bakteri simbiosis-nematoda memiliki perbedaan strategi dalam menekan respon imun inangnya.

Serangga memiliki respon pertahanan seluler ketika bakteri menginfeksi berupa fagositosis. Ketika sejumlah bakteri terdapat pada haemolimp maka permukaan sel hemosit yang aktif memanjang membentuk filopodia dan merekat pada sel bakteri, lalu bergabung dengan matriks ekstraseluler membentuk nodul. Pada akhirnya nodul keluar dari sistem sirkulasi umum serangga menuju jaringan lemak. Namun bakteri simbiosis-NEP sangat mampu toleransi atau tahan terhadap respon pertahanan seluler serangga dikarenakan bakteri simbiosis-NEP memiliki fase pertumbuhan yang sangat cepat. Serangga juga memiliki respon imun humoral yakni menghasilkan enzim haemolimp seperti lisozim yang dapat mendegradasi dinding sel bakteri, namun bakteri simbiosis-NEP juga mampu tahan terhadap enzim tersebut (Dunn, 1986).

Bakteri simbiosis-NEP menggunakan ketahanannya dalam haemolimp serangga untuk menghambat aktivasi enzim phenoloxidase, enzim phenoloxidase berperan dalam mengaktifkan reaksi perubahan senyawa tirosin menjadi dihydroxyphenylalanin. Modifikasi senyawa phenylalanine dapat mengikat permukaan bakteri untuk memulai proses melanisasi. Peran melanisasi pada respon pertahanan serangga yaitu untuk opsonisasi (penandaan) proses perlekatan sel bakteri pada hemosit. Akan tetapi bakteri simbiosis *Xenorhabdus* spp. memiliki senyawa lipopolisakarida yang dapat mencegah pembentukan prophenoloxidase menjadi phenoloxidase (forst dan Neelson, 1996).

Haemolimp merupakan sumber protein, dan bakteri dapat tumbuh melimpah didalam haemolimp inang (Gaugler, 2001). Pada tahap ini, secara normal, larva serangga mati setelah 24-48 jam bakteri menginfeksi. Selama fase stasioner, bakteri

memproduksi beberapa molekul, mencakup antimikroba dan eksoenzim yang sangat penting bagi hubungan timbal balik (simbiosis) dengan nematodanya. Ketika bakteri dikulturkan pada media artifisial (buatan), bakteri simbiosis memproduksi berbagai kombinasi protease, kitinase, dan lektinase selama fase post-eksponensial dari pertumbuhannya (Akhurst dan Boemare, 1990). Senyawa-senyawa tersebut dapat merombak (biokonversi) bangkai inang menjadi sumber makanan bagi nematoda.

## 2.2 PCR ( *Polymerase Chain Reaction* )

PCR (*Polymerase Chain Reaction* ) merupakan suatu reaksi in vitro untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target dengan bantuan enzim DNA polymerase dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu termocycler. Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Teknik PCR digunakan untuk memperbanyak sekuen DNA tertentu dengan waktu relatif singkat (beberapa jam). Dengan PCR, molekul DNA dapat diperbanyak sampai jutaan kopi. oleh karena itu teknik ini bisa disebut amplifikasi DNA. Dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTP yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenine*), dCTP (*Cytosine*), dGTP (*Guanine*) dan dTTP (*Thymine*). Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah: DNA target, primer, enzim Taq DNA *polymerase*, *deoxynucleoside triphosphat* (dNTP), dan larutan penyangga (*buffer*) (Muladno, 2002).

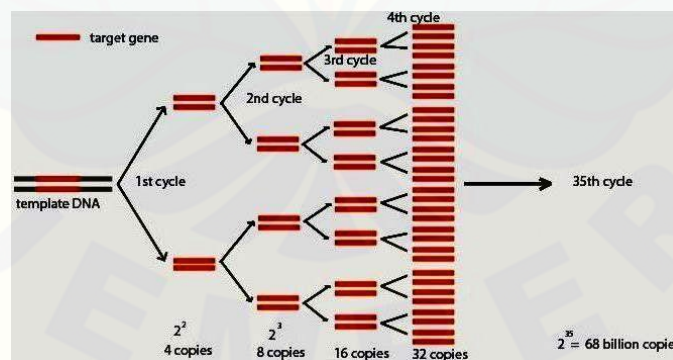
PCR melibatkan banyak siklus yang masing-masing terdiri dari tiga tahap berurutan, yaitu pemisahan (denaturasi) rantai DNA templat, penempelan (annealing) pasangan primer pada DNA target dan pemanjangan primer (extension) atau reaksi polimerisasi yang dikatalisis oleh DNA polymerase. Tiga tahap pada siklus PCR adalah sebagai berikut:

1. Denaturasi. Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi

menyebabkan putusny ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu  $90^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ .

2. Penempelan primer (annealing). Primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu  $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya, DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada  $72^{\circ}\text{C}$ .
3. Reaksi polimerisasi (extension). Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$ . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polimerase.

Didalam proses PCR, terjadi siklus yang berulang. 1 copy DNA setelah satu siklus akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 copy dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial (Gaffar, 2007). Seperti pada Gambar 2.2, siklus PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus.



Gambar 2.2 Ilustrasi Amplifikasi PCR (Sumber: Vierstraete, 1999)

Produk PCR adalah Amplikon (segmen DNA) yang berada dalam jumlah jutaan copy, tetapi tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Oleh karena itu perlu



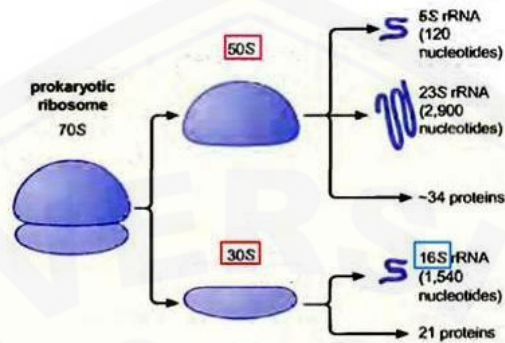
adanya visualisasi produk PCR yaitu dengan cara elektroforesis gel agarosa. Selain untuk mendeteksi, elektroforesis gel agarosa juga bertujuan untuk mengetahui ukuran Amplikon dan mengetahui kesesuaian amplikon dengan yang diinginkan (Gaffar, 2007). Hasil elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada UV eliminator.

### **2.3 16S rRNA sebagai Dasar Identifikasi secara Molekuler & Penentuan Pohon Filogeni**

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan analisis fenotipik dan analisis genotipik. Analisis fenotipik yaitu cara identifikasi dengan menganalisis karakter morfologi, sifat fisiologis atau biokimia, sedangkan analisis Genotipik yaitu identifikasi dengan menganalisis gen secara molekuler (Hadioetomo 1993). Beberapa tujuan identifikasi dengan menggunakan karakter fenotip sebagian besar dapat terpenuhi, namun terdapat juga beberapa keterbatasan dalam mengidentifikasi bakteri secara fenotipik. Seperti adanya bakteri yang pertumbuhannya menyulitkan (tidak dapat dikulturkan), banyaknya variasi morfologi, reaksi biokimia yang berubah-ubah, dan belum adanya pengenalan (rekognisi) karakter sebelumnya (Han *et al.*, 2002). Kemajuan teknologi telah mengatasi keterbatasan ini, salah satu kemajuan yang diwujudkan yaitu identifikasi dengan cara menganalisis urutan nukleotida 16S ribosomal RNA (16S rRNA), yang muncul sebagai metode identifikasi yang akurat dalam mengidentifikasi bakteri (Drancourt *et al.*, 2000).

rRNA (*ribosomal RNA*) merupakan salah satu jenis molekul dari tiga jenis molekul RNA hasil transkripsi (tRNA, mRNA dan rRNA). rRNA dan protein ribosomal membentuk suatu kompleks menjadi partikel ribonukleoprotein yang disebut ribosom. Ribosom inilah yang berperan dalam sintesis protein (Gaffar, 2007). Ribosom pada prokariot merupakan molekul dengan koefisien sedimentasi 70S dan memiliki berat sekitar  $2,7 \times 10^6$  Da. Ribosom ini terdiri dari dua subunit, yaitu subunit kecil (*small subunit*) dengan koefisien sedimentasi 30S dan subunit besar (*large subunit*) dengan koefisien sedimentasi 50S. Pada subunit 30S mengandung molekul 16S rRNA dan 21 macam protein, dan pada subunit 50S terdiri atas 31

protein dan 2 molekul rRNA yaitu 23 rRNA dan 5S rRNA (Lewin, 1998)., (Gambar 2.3)



Gambar 2.3 Struktur ribosom pada prokariot (Sumber: Usmle, 2012)

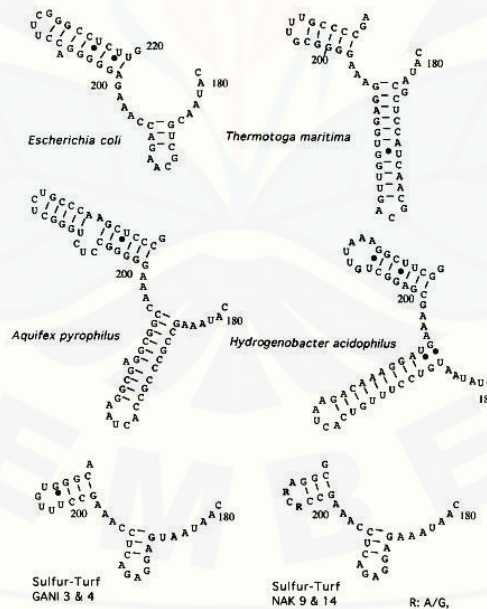
Di antara ketiganya, 16S rRNA merupakan rRNA yang paling sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri, karena panjang basanya ideal yaitu 1540 nukleotida, sehingga informasi genetik yang dimilikinya cukup banyak dan lebih mudah diolah (Madigan *et al.*, 1997). Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek yaitu sekitar 120 nukleotida, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara itu molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang yaitu sekitar 2900 nukleotida, sehingga sulit untuk dianalisis (Pangastuti, 2006).

Identifikasi menggunakan molekul yang dikode gen 16S rRNA dikarenakan beberapa alasan yaitu: (1) bersifat universal pada kelompok organisme prokariot (2) urutan nukleotidanya bersifat konservatif dan variatif; (3) jumlahnya melimpah dalam sel; (4) memenuhi ukuran untuk perhitungan secara statistika (tidak terlalu panjang dan terlalu pendek); (5) ketersediaan informasi (data bank/database di GenBank) (Madigan *et al.*, 1997). Molekul 16S rRNA memiliki beberapa daerah yang memiliki urutan basa yang relatif konservatif dan beberapa daerah urutan basanya variatif. Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang

bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies (Pangastuti, 2006).

Informasi genetik pada molekul rRNA secara fungsional bersifat seragam pada setiap organisme, yaitu terlibat dalam sintesis protein. Meski demikian, molekul ini juga dapat berubah pada level struktur primer sambil tetap mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homologus sesuai jarak evolusinya (Schluenzen *et al.*, 2000), sehingga hubungan filogeni (kekerabatan) dari taksa yang berdekatan dapat dianalisis, dapat juga digunakan sebagai kronometer evolusi (Pangastuti, 2006).

Data urutan basa gen penyandi 16S rRNA memungkinkan digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme, tetapi organisme yang sekerabat atau identik berdasarkan parameter ini belum tentu memiliki kesamaan secara fisiologi (Ward, 1998). Hal ini disebabkan gen penyandi 16S rRNA bukan merupakan suatu gen yang fungsional untuk kelangsungan hidup dan adaptasi prokaryota pada lingkungan tertentu.



Gambar 2.4 Perbandingan Struktur sekunder 16 rRNA beberapa eubakteria pada posisi basa 179 sampai 220 (Sumber: Yamamoto *et al.*, 1998)

Gambar 2.4 menunjukkan adanya kekerabatan struktur sekunder 16S rRNA antara spesies bakteri Sulfur-Turf NAK 9&14 dan spesies bakteri Sulfur-Turf GANI 3&4 (Yamamoto *et al.*, 1998). Analisis gen penyandi 16S rRNA merupakan metode yang praktis untuk identifikasi spesies, karena molekul ini bersifat ubiquitus (terdapat pada semua makhluk), sehingga dapat dirancang suatu primer yang universal untuk seluruh kelompok bakteri (Pangastuti, 2006). gen 16S-rRNA hasil amplifikasi PCR disekuensing dengan mesin *sequencer*, pita yang terbentuk dideteksi oleh detektor dan dianalisis dengan computer (Madigan *et al.*, 2000).

#### 2.4 Sekuensing (Penentuan Urutan Basa Nukleotida)

DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida. Sekuensing DNA merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui urutan nukleotida atau basa dalam suatu fragmen DNA (Gaffar, 2007). Metode sekuensing merupakan salah satu terobosan utama dalam genetika molekuler yang dapat mensekuensing potongan DNA secara cepat (Muladno, 2002). DNA target yang telah diamplifikasi dengan bantuan PCR akan disekuensing sehingga urutan basa nukleotida yang dikode akan diketahui, yang nantinya dapat dijadikan bahan untuk identifikasi suatu bakteri.

Pada dasarnya ada dua macam metode sekuensing yang telah dikembangkan, yaitu metode *Maxam-Gilbert* dan metode *Sanger* yang keduanya diperkenalkan pada tahun 1977. Metode sekuensing yang paling banyak digunakan adalah metode *Sanger*. Selain lebih mudah, praktis dan efisien, metode sanger juga sudah banyak digunakan dan jutaan nukleotida dari berbagai spesies telah berhasil disekuensing dengan metode *Sanger* ini (Muladno, 2002).

Pada metode *Sanger* dikenal dengan metode terminasi rantai, dan metode *Maxam-Gilbert* dikenal dengan metode degradasi kimia (Brown, 2002). Metode *Maxam-Gilbert* melibatkan degradasi kimiawi terhadap fragmen DNA yang akan disekuensing. Mula-mula molekul DNA rantai ganda yang akan disekuensing dilabel salah satu ujungnya menggunakan fosfat radioaktif, fragmen DNA yang sudah dilabel

pada salah satu ujungnya dipotong tak sempurna (partial digest) dalam empat reaksi kimia terpisah. Tiap reaksi membuat fragmen DNA tersebut terpotong pada basa tertentu. Ini menghasilkan empat macam populasi fragmen DNA yang semua ujungnya berlabel. Tiap populasi terdiri atas campuran fragmen DNA yang panjangnya ditentukan oleh lokasi basa tertentu disepanjang fragmen DNA yang disekuensing tersebut. Populasi fragmen DNA tersebut dipisahkan dengan cara elektroforesis melalui gel polyacrilamida dan fragmen DNA yang berlabel pada ujungnya tersebut akan terdeteksi melalui cara autoradiografi (Muladno, 2002). Metode degradasi kimia (*Maxam-Gilbert*) memiliki kelemahan yaitu menggunakan bahan kimia yang beracun dan berbahaya bagi kesehatan peneliti, sehingga hal ini merupakan alasan mengapa saat ini penentuan urutan basa nukleotida (sekuensing) lebih banyak yang menggunakan metode *Sanger*.

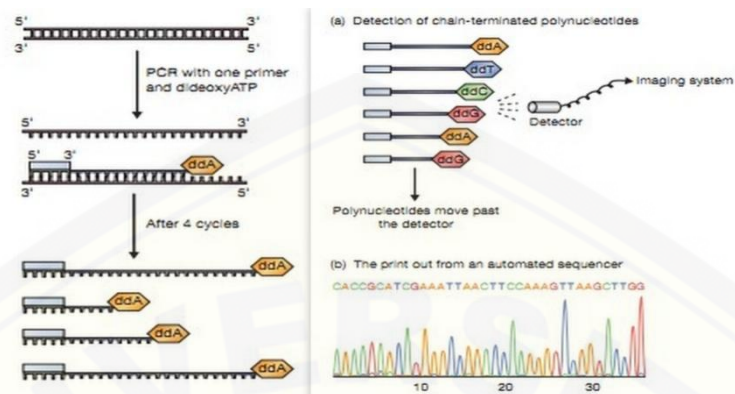
Pada metode terminasi rantai (*Sanger*) reaksi sekuensing dimulai dengan reaksi PCR untuk memperbanyak fragmen DNA. Pada Prinsipnya metode *Sanger* menggunakan pendekatan sintesis molekul DNA baru dan pemberhentian sintesis tersebut pada basa tertentu. Untuk mensintesis molekul DNA, diperlukan dNTP (Deoxynucleoside Triphosphates) sebagai bahan utamanya, sedangkan untuk menghentikan proses sintesis diperlukan ddNTP (Dideoxynucleoside Triphosphates) (Muladno, 2002). Metode *Sanger* memanfaatkan dua sifat enzim DNA polymerase yaitu kemampuan untuk mensintesis DNA dengan adanya dNTP dan ketidakmampuan membedakan antara dNTP dan ddNTP (*Sanger et al.*, 1977).

ddNTP tidak mempunyai gugus 3'-OH (hidroksil). ddNTP dapat digabungkan oleh enzim *taq polymerase* pada untai DNA yang sedang disintesis melalui gugus 5' triphosphat. Namun, tidak adanya gugus 3'-OH mencegah terbentuknya ikatan phosphodiester dengan dNTP berikutnya. Sintesis DNA tidak mungkin dilanjutkan dan berhenti pada posisi ddNTP. Dengan demikian, jika satu jenis ddNTP (misalnya ddATP) dicampur dengan dNTP dalam satu larutan reaksi, terjadi kompetisi antara dNTP yang memperpanjang molekul DNA dan ddNTP yang memberhentikan proses pemanjangan tersebut (Muladno, 2002). Hasil akhir dari

reaksi tersebut adalah sejumlah potongan DNA yang panjangnya bervariasi (bervariasi satu basa saja) dan basa terakhirnya sama bergantung dari ddNTP yang digunakan.

Fragmen-fragmen hasil sekuensing dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamid. setelah itu dilakukan pembacaan hasil elektroforesis (Gaffar, 2007). Pembacaan hasil elektroforesis dapat dilakukan bila fragmen-fragmen DNA yang terbentuk terlabeli. Pada awal perkembangan teknik DNA sekuensing, pelabelan fragmen DNA dilakukan dengan menggunakan radioisotop (Gaffar, 2007). Label juga dapat berbentuk fluoresen. Pelabelan dapat dilakukan terhadap primer maupun pada ddNTP. Pelabelan yang dilakukan pada ddNTP (*dye terminator labeling*) memberikan kemudahan karena reaksi sekuensing dilakukan hanya dalam satu tabung. Lain halnya Jika pewarnaan fluoresen dilakukan pada primer, reaksi pembentukan fragmen DNA harus dilakukan dalam empat tabung terpisah (Gaffar, 2007). Fragmen-Fragmen yang berfluoresen terbentuk karena inkorporasi ddNTP yang terlabel oleh pewarna. Masing-masing ddNTP yang berbeda (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) akan membawa sebuah warna yang berbeda. Dengan demikian semua fragmen yang diterminasi oleh metode *Sanger* (yang berujung pada ddNTP) mengandung sebuah *dye* pada ujung 3'nya.

Saat ini dengan bantuan teknologi semua dapat dilakukan dengan otomatis dan cepat dengan bantuan mesin *sequencer*, dengan divariasi menggunakan pewarna berfluoresensi pada ddNTP dan dideteksi menggunakan detektor yang terhubung dengan komputer sehingga langsung dapat diolah (Brown, 2010). Dengan ditemukannya mesin Automated Capillary Sequencer, proses pemisahan fragmen dan pembacaan urutan basa DNA dapat dilakukan dengan lebih mudah, cepat dan otomatis. Hasil pembacaan mesin sequencer disebut elektroferogram, yaitu peak-peak berwarna yang menunjukkan urutan basa DNA-nya seperti terlihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Prinsip sekuensing (*Sanger*) dengan pewarnaan flouresen pada ddNTP (Sumber: Brown, 2010).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Mei sampai Oktober 2014 di Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman (HPT) Fakultas Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Sekuensing DNA dilakukan di lembaga sekuensing 1<sup>st</sup> Base Singapura.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), tabung ulir (scrucap), inkubator, shaker, sentrifuge, mikropipet, tip, eppendorf 1,5 ml dan 2 ml, Freezer, vortex, UV gel eluminator, mesin PCR, elektroforesis, nanodrop, Sekuenser, kolom nukleospin Extract II.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu media NB (*Nutrien Broth*), media NANR (*Nutrien Agar Neutral Red*), media YS (*Yeast Salt*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*), EtBr (*Ethidium Bromide*), Buffer TBE (*Tris Boric EDTA*) 10x, 1% gel agarose, Aquades steril, loading dye, 2x Master Mix (Qiagen kit), 2,5 µl primer BOX AIR, 1,25 µl forward primer 27F dan 533F (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl), 1,25 µl reverse primer 907R dan 1492R (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl) dan 2 µl ekstrak DNA, DNA ladder 100bp dan DNA ladder 1kb sebagai marker, 200 µl buffer NT, 700 µl buffer NT3, 15-50 µl buffer NE (5 mM Tris/HCL, pH 8.5) (komposisi bahan terlampir pada lampiran A).



### 3.3 Prosedur Penelitian

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4 isolat bakteri simbion-NEP isolat lokal dan *Heterorhabditis* sp. koleksi Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman (HPT) Fakultas Pertanian Universitas Jember dari daerah Bromo Cemorolawang (CL01), Ngadas (NG01), Sapikerep (SK01), dan bakteri simbion-NEP *Heterorhabditis bacteriophora* (HB01).

#### 3.3.1 Isolasi Bakteri Simbion

Haemolimp larva serangga yang terinfeksi NEP digoreskan pada media NANR, kemudian diinkubasi suhu ruang selama 24 jam. Koloni bakteri simbion-NEP mampu merombak senyawa NR (Neutral Red) yang ada pada media NANR sehingga akan terlihat perubahan warna media disekitar munculnya koloni.

#### 3.3.2 Isolasi DNA Genom

Metode yang digunakan untuk isolasi DNA Genom Bakteri adalah metode *Freeze and Thaw* (modifikasi dari Tsai & Olson, 1991). Prinsipnya yaitu bakteri dibekukan dalam *freezer* kemudian langsung dilakukan pemanasan (*boiling*) sehingga sel bakteri akan pecah dan diharapkan DNA Genom keluar. Metode lisis secara fisik relatif lebih efektif dibandingkan dengan metode yang lain karena lebih cepat, simpel dan DNA yang dihasilkan cukup baik (Hurt *et al.*, 2001). Koloni tunggal dari media NANR ditumbuhkan pada media NB dan diinkubasi pada shaker  $\pm$  16 jam pada suhu ruang ( $\pm$  30<sup>0</sup>C). kultur cair yang tumbuh diambil 1000  $\mu$ l dan dimasukkan dalam eppendorf dan disentrifus selama 5 menit, 4<sup>0</sup>C, 13000 rpm, supernatan dibuang. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali atau beberapa kali sampai pelet yang didapatkan cukup banyak. Pelet yang diperoleh dicuci dengan PBS 1000  $\mu$ l kemudian disentrifus selama 5 menit, 4<sup>0</sup>C, 13000 rpm. Perlakuan ini juga dilakukan sebanyak 3 kali. Pelet yang diperoleh disimpan pada suhu -20<sup>0</sup>C selama 24 jam untuk ekstraksi DNA genom.

Pelet beku diekstraksi dengan cara dididihkan selama 4 menit, kemudian dilarutkan dengan 50 µl aquabides (ddH<sub>2</sub>O) steril dan diresuspensi dengan cara mikropipeting dan vortex. Suspensi tersebut disentrifus selama selama 5 menit, 4°C, 13000 rpm. Supernatan yang diperoleh mengandung materi genetik dipisahkan kemudian dilakukan running DNA genom, atau jika tidak langsung digunakan maka dapat disimpan pada suhu -20°C.

Kualitas DNA genom dapat dilihat melalui elektroforesis yaitu dengan menambahkan 1 µl *loading dye* pada 5 µl supernatan, kemudian dimasukkan dalam sumuran gel yang mengandung EtBr. DNA ladder 1kb digunakan sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada 100 V dengan buffer TBE sebagai *running buffer*. Gel dapat divisualisasi dengan meletakkan gel diatas UV gel eluminator untuk melihat ada tidaknya pita DNA genom.

### 3.3.3 BOX PCR Untuk Menjaga Kemurnian dan Stabilitas Profil Genom Isolat.

Kemurnian dan stabilitas profil genom isolat dapat ditentukan dengan BOX PCR. Berbeda dengan PCR biasanya, metode BOX PCR hanya menggunakan satu primer tunggal, yang disebut primer BOX-AIR (5'CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G3'). Primer tunggal ini akan berikatan dengan sekuen repetitif pada genom bakteri yang selanjutnya akan dipolimerasi beberapa kali. Sekuen repetitif dari genom bakteri terkonservasi dan bersifat spesifik untuk masing-masing spesies sehingga perbedaan pada profil sekuen repetitif tersebut dapat digunakan untuk menentukan polimorfisme genotip bakteri (Oda *et al.*, 2002).

PCR dilakukan dalam 25 µl reaksi mengandung 8 µl aquabides steril, 12,5 µl PCR Master Mix (Qiagen Kit), 2,5 µl primer (10 pmol/µl, konsentrasi akhir 10 pmol/µl) dan 2 µl DNA template. Gradien temperatur yang digunakan adalah : *initial denaturation* 95°C selama 6 menit, 35 Cycles pada 94°C selama 1 menit, 54°C selama 1 menit, 65°C selama 8 menit, dan *final extension* pada 65°C selama 16 menit. Produk PCR dapat dilihat melalui elektroforesis yaitu dengan menambahkan 5 µl produk PCR pada 1 % gel agarose yang mengandung EtBr. DNA ladder 1kb digunakan

sebagai marker. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada 80 V dengan *buffer* TBE sebagai *running buffer*. Visualisasi gel dapat dilakukan dengan meletakkannya pada UV gel eluminator.

#### 3.3.4 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 CTG 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). PCR dilakukan dengan mereaksikan 15 µl aquabides steril, 25 µl 2x PCR Master Mix (Qiagen Kit), 1,25 µl *forward primer* (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl), 1,25 µl *reverse primer* (5 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl) dan 2 µl ekstrak DNA. Gradien temperatur yang digunakan adalah *initial denaturation* 95°C selama 5 menit, 9 siklus pada 94°C selama 1 menit, 56°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit, 24 siklus pada 94°C selama 1 menit, 53°C selama 1 menit, 72°C selama 1 menit serta *final extension* pada 72°C selama 10 menit.

Sebelum sekuensing, kualitas DNA dari produk PCR dilihat melalui elektroforesis menggunakan marker DNA ladder 100 bp. Jika hasil elektroforesis tersebut memuaskan yaitu pita DNA terlihat jelas dan tidak ada mixing bands (pita yang tercampur), maka dilakukan pemurnian produk hasil PCR.

#### 3.3.5 Purifikasi DNA Hasil PCR

Produk PCR dimurnikan pada 1 % gel agarose mengikuti prosedur PCR clean-up Gel Extraction NucleoSpin® Extract II. Purifikasi hasil PCR dilakukan melalui pemotongan gel agarose yang mengandung pita DNA hasil PCR. Potongan gel ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dimasukkan dalam eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan 200 µl buffer NT. Sampel diinkubasi selama 5-10 menit pada 50°C kemudian divortex dengan kuat sampai potongan gel tersebut sampai bisa bercampur. Sampel kemudian dimasukkan dalam kolom NucleoSpin Extract II yang sebelumnya

telah ditempatkan pada tabung koleksi (2 ml). Sentrifugasi dilakukan pada 11.000 x g selama 1 menit sehingga cairan pada kolom akan pindah ke tabung koleksi. Cairan pada tabung koleksi dibuang dan kolom NucleoSpin Extract II ditempatkan kembali pada tabung koleksi. Kemudian 700 µl buffer NT3 (buffer pencuci) ditambahkan ke dalam kolom NucleoSpin Extract II dan disentrifugasi pada 11.000 x g selama 1 menit sampai semua buffer pindah ke tabung koleksi. Cairan pada tabung koleksi dibuang dan kolom NucleoSpin Extract II ditempatkan kembali pada tabung koleksi. Sentrifugasi dilakukan kembalipada 11.000 x g selama 2 menit untuk memindahkan sisa-sisa buffer, karena sisa ethanol dari buffer NT3 dapat menghambat reaksi subsekuen. Penghilangan sisa-sisa buffer secara total dapat dilakukan dengan inkubasi kolom NucleoSpin Extract II selama 2-5 menit pada 70°C. selanjutnya kolom NucleoSpin Extract II dipindahkan kedalam tabung 1,5 ml steril. DNA pada kolom dielusi dengan 15-50 µl buffer NE dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit untuk meningkatkan hasil elusi DNA. Sentrifugasi dilakukan pada 11.000 x g selama 1 menit sehingga diperoleh DNA murni.

### 3.3.6 Analisis Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA

Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR ke 1<sup>st</sup> Base Singapura. Data kasar hasil sekuensing selanjutnya dilakukan *editing* dan analisis menggunakan Bioedit software (Tom Hall, Ibis Therapeutics). Setelah diketahui alignment sekuen DNA pengkode 16S rRNA dari masing-masing isolat maka sekuennya dibandingkan dengan database gen 16S rRNA di *Gene Bank* menggunakan BLAST online software di (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). untuk menentukan spesies dari isolat bakteri dan hubungan kekerabatannya.

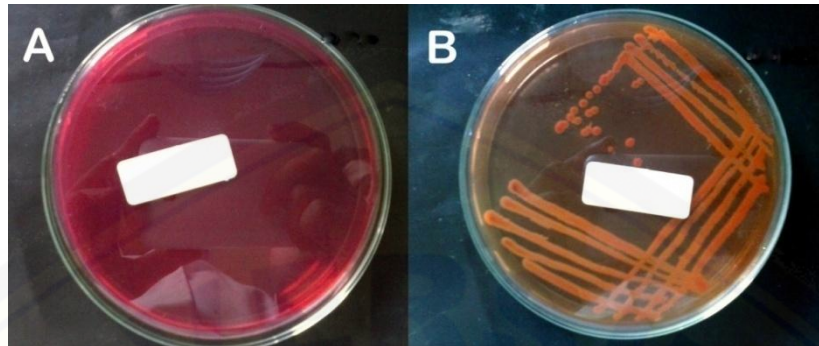
## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri simbiosis diperoleh dengan cara menginfeksi NEP terlebih dahulu ke larva serangga umpan *Galleria mellonella* (Chaerani *et al.*, 2007). Gejala larva serangga terinfeksi NEP *Steinernema* sp. berwarna hitam, tidak ada perubahan tekstur tubuh sebelum maupun setelah terinfeksi dan bangkainya tidak berbau menyengat (busuk). Berbeda dengan gejala larva serangga terinfeksi NEP *Heterorhabditis* sp. yang berwarna coklat kemerahan (oranye), tidak ada perubahan tekstur tubuh sebelum maupun setelah terinfeksi, bangkainya tidak berbau menyengat (busuk), bila dibedah jaringan tubuhnya agak lengket, berwarna coklat kekuningan (Kaya dan Gaugler 1993)., jika demikian, dapat dipastikan bakteri simbiosis ada di dalam cairan haemolimp umpan yang terinfeksi, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 (A) Larva terinfeksi NEP *Steinernema* sp. (B) Larva terinfeksi NEP *Heterorhabditis* sp. (Kamera CASIO EX-ZS5, edit dengan PICASA 39)

Media NANR (*Nutrien Agar Neutral Red*) digunakan sebagai media selektif untuk membedakan antara koloni bakteri simbiosis-NEP dengan koloni bakteri lain, koloni bakteri simbiosis-NEP mampu merombak senyawa NR (*Neutral Red*) pada media NANR sehingga akan terlihat perubahan warna media disekitar tumbuhnya koloni bakteri (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 (A) Media NANR steril (B) Isolat bakteri simbion-NEP pada media NANR (Kamera LG-E435, edit dengan PICASA 39)

Untuk memastikan lagi bahwa bakteri yang tumbuh pada media NANR merupakan simbion-NEP, maka isolat bakteri ditumbuhkan dalam media cair YS (Yeast Salt). Hasil pengamatan menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada media YS setelah masa inkubasi. Hal ini ditandai dengan kekeruhan pada media YS.

Muchlisin dan Ekowati (2001) telah mengkarakterisasi bakteri simbion-NEP berdasarkan karakter biokimia. Untuk karakterisasi lanjutan berdasarkan karakter genotip menggunakan sekuen DNA pengkode 16S rRNA sebagai kunci identifikasi, maka dilakukan isolasi DNA genom bakteri simbion-NEP sebagai templat PCR, untuk BOX PCR yang mengamplifikasi sekuen repetitif, dan PCR 16S rRNA yang mengamplifikasi sekuen DNA pengkode 16S rRNA.

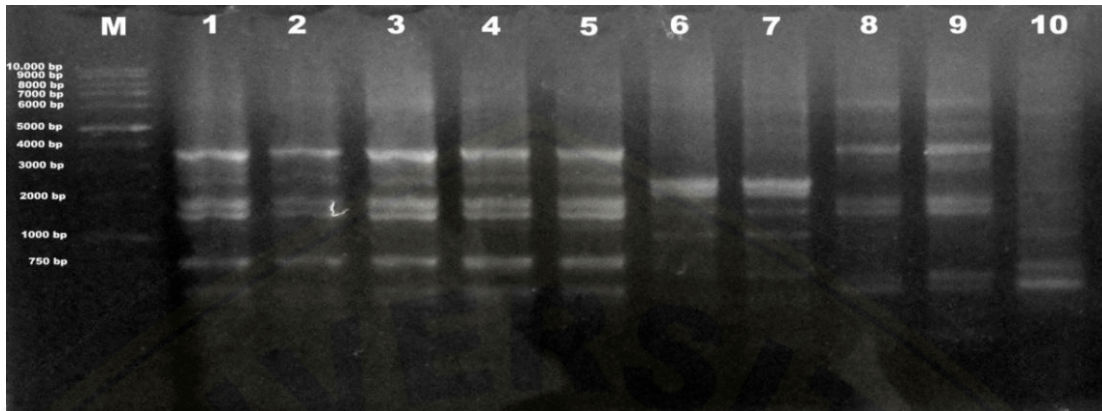
Hasil isolasi DNA genom bakteri simbion-NEP ditunjukkan pada Gambar 4.1, dari empat lokasi asal bakteri simbion, semuanya nampak adanya pita DNA yang berada diatas pita marker teratas, dapat dipastikan bahwa pita DNA yang muncul merupakan pita DNA genom bakteri simbion-NEP, bukan DNA plasmid maupun DNA organel (mitokondria atau kloroplas). DNA genom bakteri memiliki ukuran diatas 1 Mbp, misalkan DNA genom *E. coli* yaitu berukuran 4.6-Mbp (Binnewies *et al*, 2006)., DNA plasmid memiliki ukuran relative kecil sekitar 1-300 Kb, sedangkan DNA organel (mitokondria atau kloroplas) tidak terdapat pada sel bakteri, dikarenakan sel bakteri tidak memiliki organel tersebut.



Gambar 4.3 Visualisasi Hasil Isolasi DNA Genom Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo. Marker 1Kb, 1. Bakteri Symbion-NEP CL01, 2. NG01, 3. SK01, 4. HB01 (Kamera SONY D5322, edit dengan Picasa 39)

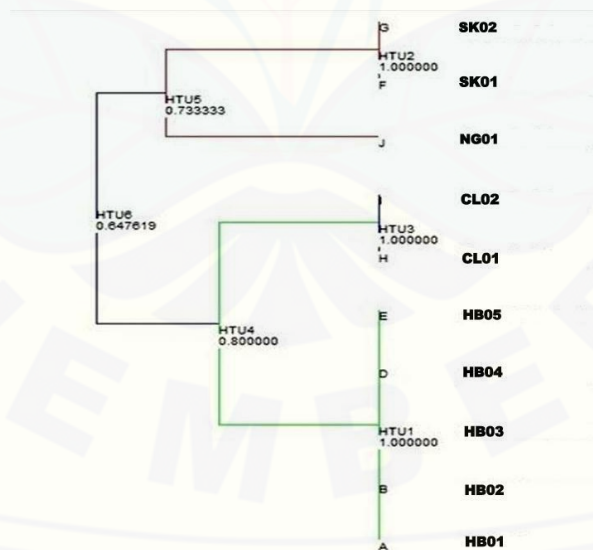
#### 4.1 Kekerbatan Isolat Lokal Bakteri Symbion-NEP berdasarkan Sekuen DNA Pengkode BOX AIR

Pada genom bakteri terdapat sekuen DNA berulang (*repetitive DNA*), *conserved DNA* (DNA yang dilestarikan). BOX PCR merupakan metode penyalinan DNA berbasis PCR dengan menggandakan salinan DNA target yaitu repetitif DNA menggunakan primer *BOX AIR* (5'CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G3'). BOX PCR dilakukan untuk mengamati profil sidik jari genom dengan melihat perbedaan atau kesamaan pola migrasi pita DNA. Jumlah pita DNA akan terlihat lebih jelas dan lebih banyak, sehingga terlihat jelas perbedaan pada profil genom masing-masing isolat bakteri (Savas *et al.*, 2009). Data hasil analisis dari BOX PCR dapat digunakan sebagai data tambahan untuk perbandingan dengan hasil data PCR 16S rRNA.



Gambar 4.4 Profil Genom Bakteri Simbion-NEP Isolat Lokal Asal Bromo berdasarkan BOX PCR. Marker 1Kb, 1-5. Bakteri Simbion HB01, HB02, HB03, HB04, HB05 6-7.SK01, SK02 8-9. CL01, CL02 10. NG01 (Kamera SONY D5322, edit dengan PICASA 39)

Hasil BOX PCR pada Gambar 4.4 menunjukkan bahwa masing-masing isolat bakteri simbion HB, SK, CL, dan NG terdapat diversitas genetik. Data hasil BOX PCR digunakan pembuatan kontruksi pohon filogeni untuk analisis kekerabatan antar isolat-isolat bakteri simbion-NEP isolat lokal Bromo (Gambar 4.5). dan selanjutnya dilakukan identifikasi dengan mengamplifikasi gen pengkode 16S rRNA.

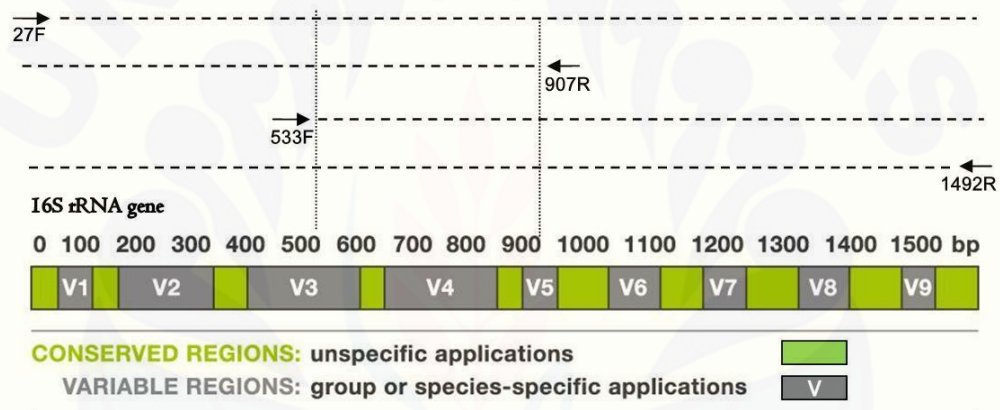


Gambar 4.5 Pohon filogeni bakteri simbion berdasarkan pola migrasi hasil BOX PCR menggunakan Clad97



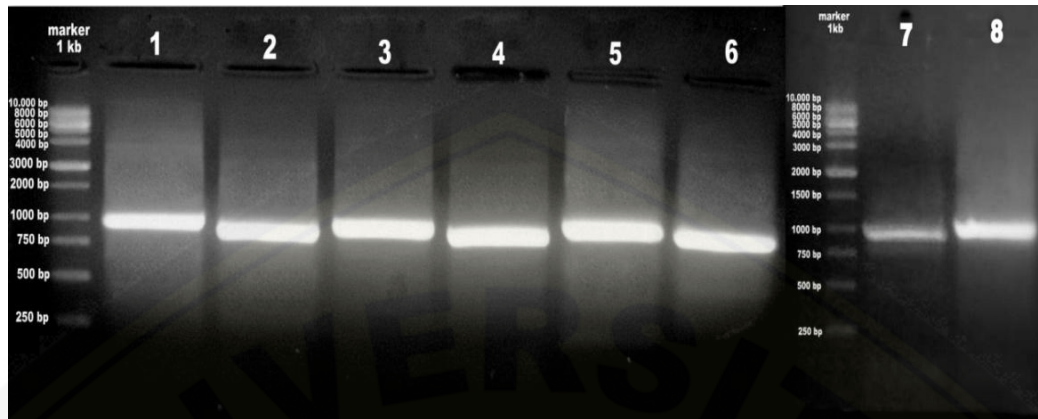
#### 4.2 *Providencia vermicola*, Bakteri Symbion-NEP Isolat Lokal Cemorolawang dan Sapikerep

DNA pengkode 16S rRNA bakteri symbion-NEP diamplifikasi menggunakan dua pasang primer universal 16S rRNA, yaitu 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTG 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). Masing-masing pasangan primer akan mengamplifikasi daerah variabelnya, sehingga dengan dua pasang primer, diharapkan semua gen pengkode 16S rRNA dapat teramplifikasi (Gambar 4.6).



Gambar 4.6 Posisi dua Pasang Primer Mengamplifikasi Gene 16S rRNA untuk Memperoleh Sekuen Utuh.

Pasangan primer 27F-907R akan menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 873 bp, akan tampak sejajar dengan pita DNA marker yang berukuran 900 bp. Sedangkan pasangan primer 533F-1492R akan menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 959 bp, akan tampak sejajar dengan pita DNA marker yang berukuran 1000 bp. Hal serupa juga diperoleh Fitiyah dan Dwitanto (2011) yang menggunakan dua pasang primer yang sama diatas untuk mengamplifikasi sekuen DNA pengkode 16S rRNA.



Gambar 4.7 Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA Pengkode 16S rRNA Bakteri Symbion-NEP. Marker 1Kb; 1,2. Bakteri Symbion CL01 533F-1492R, 27F-907R; 3,4. Bakteri Symbion NG01 533F-1492R, 27F-907R; 5,6. Bakteri Symbion SK01 533F-1492R, 27F-907R; 7,8. Bakteri Symbion HB01 27F-907R,533F-1492R (Kamera SONY D5322, edit dengan PICASA 39)

Pada Gambar 4.5 terlihat pita tunggal hasil produk PCR 16S rRNA pada hasil visualisasi elektroforesis gel agarosa 1%, hal ini mengindikasikan bahwa kedua pasang primer dapat mengamplifikasi secara spesifik fragmen DNA yang diharapkan. Dari hasil visualisasi PCR 16S rRNA, maka semua sampel selanjutnya dilakukan proses sekuensing.

Untuk keperluan sekuensing DNA Pengkode 16S rRNA agar mendapatkan hasil sekuensing dengan kualitas yang baik, maka DNA yang disekuensing harus DNA 16S rRNA murni, tidak terkontaminasi pengotor ataupun sisa-sisa reaksi PCR. Kualitas kemurnian DNA sampel yang baik yaitu memiliki nilai rasio absorbansi  $A_{260}/A_{280}$  antara 1,8-2,0. Nilai rasio absorbansi yang kurang dari 1,8 diindikasikan DNA sampel terkontaminasi protein, sedangkan jika nilai rasio absorbansi lebih dari 2,0 diindikasikan DNA terkontaminasi RNA (Sambrook and Russell, 2001).

Hasil purifikasi DNA hasil PCR 16S rRNA sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 pada Gambar 4.6 memiliki konsentrasi DNA secara berurutan: 60 ng/ $\mu$ l, 56 ng/ $\mu$ l, 27 ng/ $\mu$ l, 37 ng/ $\mu$ l, 32 ng/ $\mu$ l, 45 ng/ $\mu$ l, 49 ng/ $\mu$ l dan 47 ng/ $\mu$ l menurut hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian menggunakan nanodrop. Sedangkan nilai rasio absorbansi

$A_{260}/A_{280}$  kemurnian masing-masing DNA sampel secara berurutan: 1.59, 1.49, 1.73, 1.68, 1.80, 1.68, 1.35, 1.80.



Gambar 4.8 Visualisasi hasil Purifikasi DNA Pengkode 16S rRNA Bakteri Symbion-NEP. Marker 1Kb; 1,2. Bakteri Symbion CL01 27F-907R,533F-1492R; 3,4. Bakteri Symbion NG01 27F-907R ,533F-1492R; 5,6. Bakteri Symbion SK01 27F-907R,533F-1492R; 7,8. Bakteri Symbion HB01 27F-907R,533F-1492R (Kamera SONY D5322, edit dengan PICASA 39)

Pengukuran konsentrasi DNA dapat juga dihitung dengan membandingkan intensitas pita DNA sampel hasil purifikasi dengan intensitas konsentrasi pita DNA marker, pada kertas manual nilai konsentrasi DNA marker. Adapun kekurangannya adalah tidak dapat diketahui nilai kuantitatif konsentrasi DNAny, karena dilakukan pengamatan visual, selain itu pengamatan secara visual bersifat subyektif.

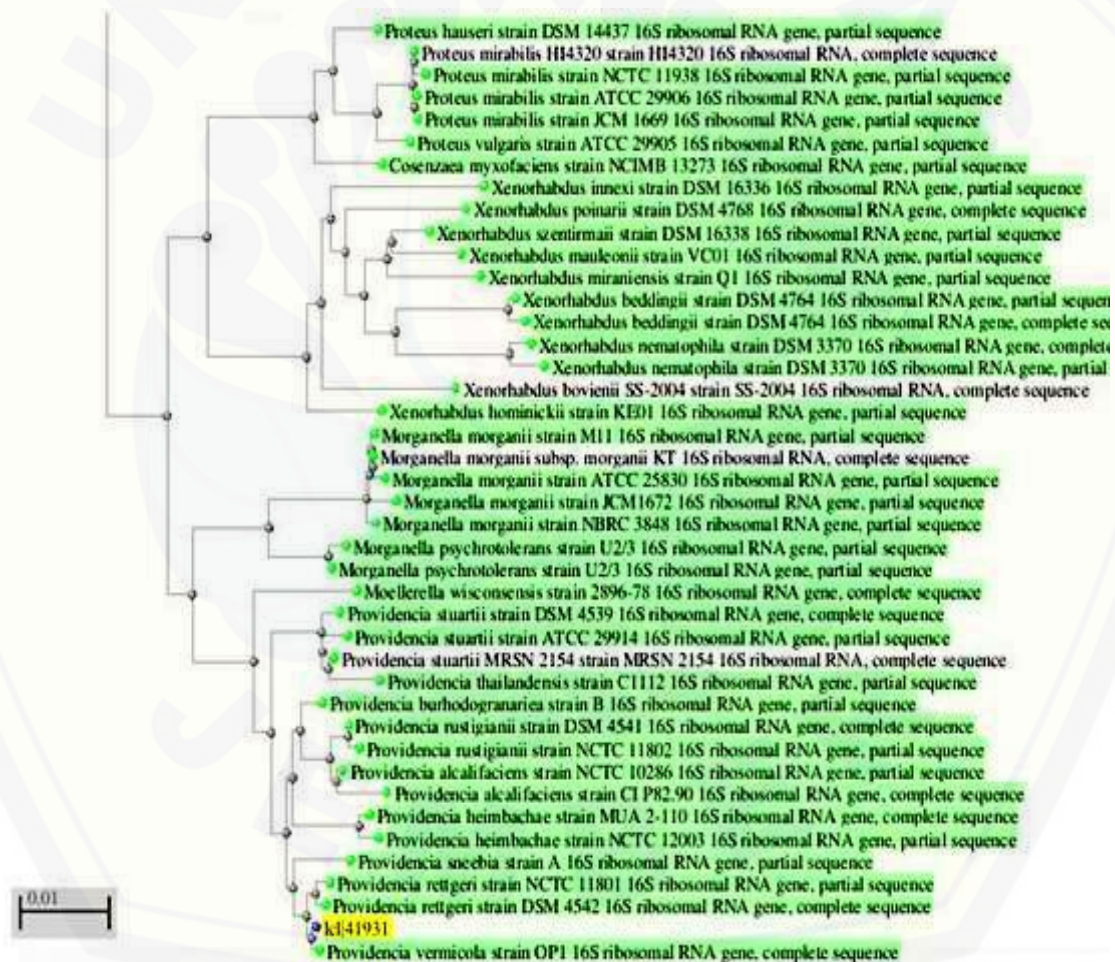
Berdasarkan hasil pembacaan urutan basa nukleotida (sekuensing) hasil PCR 16S rRNA, diperoleh sekuen dengan jumlah nukleotida yang bervariasi. Hasil editing dan analisis gabungan pensejajaran sekuen (*Pairwise Sequence Alignment*) (Lampiran C), didapatkan 3 isolat yang memungkinkan untuk dianalisis lebih lanjut terkait DNA pengkode 16S rRNA-nya. Isolat tersebut adalah CL01 (1450 pb), SK01 (1425 pb), dan NG01 (1203 pb) (Lampiran B). Analisis homologi sekuen DNA pengkode 16S rRNA digunakan BLAST software pada GeneBank (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>). Isolat bakteri symbion NG01 memiliki kemiripan dengan sekuen bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Strain SNP0614 dengan persentase

kemiripan 98%. Sementara itu isolat CL01 dan SK01 memiliki kemiripan dengan sekuen bakteri *Providencia vermicola* Strain OP1 dengan persentase kemiripan 99% seperti terlihat pada tabel 4.1. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Strain SNP0614 merupakan bakteri yang dapat diisolasi dari tumbuhan, hewan, dan manusia. Kelompok bakteri ini dapat ditemukan di kolam renang, bak mandi, pelembab ruangan, tanah dan sayuran. bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat bersifat patogen terhadap manusia (Pollack, 1995). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Strain SNP0614 bukan tergolong dalam bakteri yang bersimbiosis dengan nematoda entomopatogen. Bakteri ini kemungkinan berasal dari kontaminan dari tanah ataupun dari hewan umpan larva *Galleria mellonella* pada saat dilakukan isolasi bakteri, kemungkinan kontaminasi terjadi karena serangga umpan mati bukan karena infeksi nematoda entomopatogen.

Tabel 4.1 Beberapa Nama Spesies Bakteri yang Memiliki Kemiripan Terdekat dengan Isolat Bakteri Symbion CL01 Berdasarkan Urutan Basa Nukleotida DNA Pengkode 16S rRNA pada Gene Bank.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia vermicola strain OP1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2654	2654	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_042415.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia rettgeri strain NCTC 11801 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2638	2638	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_115880.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia rettgeri strain DSM 4542 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2638	2638	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_042413.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia burhodogranaireia strain B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2590	2590	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_104914.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia sneebia strain A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2580	2580	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_104913.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia stuartii MRSN 2154 strain MRSN 2154 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	2579	2579	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_102978.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia rustiqianii strain DSM 4541 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	2573	2573	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_042411.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia alcalifaciens strain NCTC 10286 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2571	2571	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_115879.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia stuartii strain ATCC 29914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2571	2571	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_024848.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Providencia rustiqianii strain NCTC 11802 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2562	2562	99%	0.0	99%	<a href="#">NR_115881.1</a>

Dari Tabel 4.1 menunjukkan nilai homologi isolat bakteri simbion CL01 dengan sekuen 16S rRNA bakteri *Providencia vermicola* Strain OP1, tercover nilai total pasangan basa (*total score*) 2654, nilai kesamaan pasangan basa (*max score*) 2654, presentase analisis keseluruhan (*query coverage*) 99%, presentase kesalahan (*E value*) 0.0, dan presentase tingkat kemiripan (*max identity*) 99% dari sekuen utuh. Menurut taksonomi, *Providencia vermicola* termasuk dalam Kingdom Bacteria, Filum Proteobacteria, Kelas Gammaproteobacteria, Ordo Enterobacteriales, Famili Enterobacteriaceae, Genus *Providencia*.



Gambar 4.9 Pohon Filogeni kedekatan antara isolat bakteri simbion CL01 dengan isolat bakteri yang terdapat di Gene Bank BLAST NCBI (PrintScreen AXIOO CENTAUR)

Gambar 4.9 menunjukkan rekonstruksi pohon filogeni bakteri simbion CL01 yang berkerabat dekat dengan bakteri *Providencia vermicola* Strain OP1 membentuk satu cluster (cabang). *Providencia vermicola* Strain OP1 merupakan bakteri Gram negatif, koloni sirkular, diameter koloni 1.8 – 2.2 mm, mengkilap, berlendir, cembung, buram dengan bagian tengah kecoklatan, pada media MacConkey agar koloni berwarna merah muda, dan pada media NBTA koloni berwarna krim. Oksidase negatif, katalase positif, mereduksi urease dan nitrat, mampu memfermentasi glukosa, dapat tumbuh sampai suhu 41<sup>0</sup>C dan diisolasi dari nematoda stadium *infektif juvenile* jenis *Steinernema thermophilum*, yang diambil dari pertanian New Delhi, India (Somvanshi *et al.*, 2006).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil BOX PCR, terdapat diversitas genetik pada isolat-isolat bakteri simbion-NEP isolat lokal asal Bromo Jawa Timur. Hasil analisis sekuen gen pengkode 16S rRNA menunjukkan bahwa dua sekuen isolat CL01 dan SK01 merupakan bakteri simbion *Providencia vermicola* yang bersimbion dengan NEP jenis *Steinernema thermophilum* dengan presentase kemiripan 99%.

### 5.2 Saran

Penelitian ini dapat dilanjutkan mengenai identifikasi sekaligus isolasi gen penyandi toksin insektisidal bakteri simbion-NEP isolat lokal. Dapat juga dikembangkan ke arah produksi bioentomotoksin bakteri simbion secara masal untuk pengembangan pertanian organik di Indonesia.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Arifin, K. 2011. Penggunaan musuh alami sebagai komponen pengendalian hama padi berbasis ekologi. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 4:29-46.
- Akhurst, R.J., and Boemare, N.E. 1990. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus* in: Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida. PP. 75-90.
- Binnewies, T., Motro, Y., Hallin, P.F., Lund, O., Dunn, D., La, T., Hampson, D.J., Bellgard, M., Wassenaar, T.M., Ussery, D.W. 2006. Ten Years of Bacterial Genome Sequencing: Comparative-Genomics-Based Discoveries.
- Boemare, N. E., Laumond, C., Mueleon, H. 1996. The Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex: Biology, Life Cycle and Vertebrate Safety. *Journal Biocontrol science and Tecnology*. O: 227-233p.
- Boemare, N., Givaudan, A., Brehelin, M., and Laumond, C. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes. *Symbiosis* 22, 21– 45.
- Boemare, N.E. and Akhurst, R.J. 1988. Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology* 134, 751-761.
- Brown, T.A. 2002. *Genomes*, 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford : Garland Science Ltd. ISBN-10: 0-471-25046-5.
- Brown, T.A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis. An Introduction*. Sixth Edition. Willey-Blacwell Published : Manchester.
- Chaerani & Nurbaeti B. 2006. Efektivitas nematoda patogenik serangga (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) terhadap penggerek batang padi putih (*Scirpophaga innotata*). *J. Perlind. Tan. Ind.* 12(2): 92-103.
- Chaerani & Nurbaeti B. 2007. Uji efektivitas nematoda entomopatogen (Rhabditida: *Steinernema* dan *Heterorhabditis*) sebagai musuh alami non-endemik penggerek batang padi kuning (*Scirpophaga incertulas*). *JHPTT* (2): 71-19.



- Chaerani, Y. Suryadi, T.P. Priyatno, D. Koswanudin, U. Rahmat, Sujatmo, Yusuf, dan C.T. Griffin. 2007. Isolasi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis*. JHPT Tropika 7(1):1-9
- Chaerani & Waluyo. 2006. Pencarian nematoda patogenik serangga (*Steinernema* dan *Heterorhabditis*) yang efektif untuk pengendalian hama lanas (*Cylas formicarius*) ubi jalar. Widyariset 9(3): 19-28.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol, 38, 3623–30.
- Dunn, P. E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. Annu. Rev. Entomol. 31:321–339.
- Dwinanto, R. 2011. Identifikasi Isolat Bakteri dari Pantai Papuma Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA. Tidak diterbitkan. Skripsi. Universitas Jember : Jember.
- Ehlers RU. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. Biocont. Sci. Tech. 6: 303-316.
- Ekowati, Dian. 2001. Determinasi Isolat Bakteri Symbion Nematoda *Steinernema* spp. dari daerah Jember, Bondowoso, Probolinggo dan Malang. Skripsi Fakultas pertanian Universitas Jember : Jember.
- Fitriyah, D. 2011. Identifikasi Isolat Bakteri dari Pantai Bandalit Jember Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA. Tidak diterbitkan. Skripsi. Universitas Jember : Jember
- Forst, S., and Nealon, K. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp., and *Photorhabdus* spp. Microbiol. Rev. 60, 21–43.
- Gaffar, Shabarni. 2007. Buku Ajar Bioteknologi Molekul. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Padjajaran.
- Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Gaugler, R. 2001. Entomopathogenic nematology. CABI Publishing: New York.

- Hadioetomo RS. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan prosedur dasar laboratorium. PT Gramedia, Jakarta.
- Han, X. Y., Pham, A. S., Tarrand, J. J., Sood, P. K., & Luthra, R. (2002). Rapid and accurate identification of mycobacteria by sequencing hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene. *Am J Clin Pathol*, 118, 796–801.
- Hurt, Qiu, Wu, Roh, Palumbo, Tiedje, Zho. 2001. Simultaneous Recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67 (10): 4495-4503.
- Kaya, H. K. & R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing, p. 115-147. In: Stackebrandt an M. Goodfellow (ed.), *Nucleid acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York. NY.
- Lewin, Benjamin. 1998. *Genes*, 6<sup>th</sup> ed. New York : Oxford University Press.
- Liu, J., Berry, R. E., Poinar, G. O., Jr., and Moldenke, A. F. 1997. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 948 –951.
- Liu, J., Berry, R. E., and Blouin, M. S. 2001. Identification of Symbiotic Bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* Based on 16S rDNA Sequence. *Journal of Invertebrate Pathology* 77, 87–91.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J. 1997. *Brock, the Biology of Microorganisms*. 8<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall. Upper saddle River. New jersey.
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J. 2000. *Brock, the Biology of Microorganisms*. 9<sup>th</sup> Edition. Prentice Hall. Upper saddle River. New jersey. 171-176, 434-435, 504-507, 794-797.
- Muchlisin. 2001. Karakteristik Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen *Heterorhabditis* sp. (*Photorhabdus luminenscens*). Skripsi Fakultas pertanian Universitas Jember : Jember.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda: Bogor.

- Murfin, K. E., Dillman, A. R., Foster, J. M., Bulgheresi, S., Slatko, B. E., Sternberg, P. W., Blair, H. G. 2012. Nematode-Bacterium Symbioses—Cooperation and Conflict Revealed in the “Omics” Age. *Journal of Marine Biological Laboratory. Biol. Bull.* 223: 85–102.
- Nugrohorini. 2009. Pengembangan dan Pemanfaatan Agensi Hayati (Nematoda Entomopatogen) pada Budidaya Sayuran di Jawa Timur. Balai Penelitian, Jawa Timur.
- Ochman, H., Lerat, E., & Daubin, V. 2005. Examining Bacterial Species Under The Specter of Gene Transfer and Exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 102: 6595-6599.
- Oda, Wanders, Lois, Wim, Jan, & Larry. 2002. Genotypic and Phenotypic Diversity within Species of Purple Nonsulfur Bacteria isolated from Aquatic Sediments. *Journal Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 68 (7) : 3467-3477.
- Pangastuti, Artini. 2006. Review Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein. *Jurnal ISSN: 1412-033X*, 292-296.
- Poinar, G. O., Jr. 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica* 12, 105–108.
- Pollack, M. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* , p. 1820–2003. In G. L. Mandell, R. Dolan, and J. E. Bennett (ed.), *Principles and practices of infectious diseases*. Churchill Livingstone, New York, NY.
- Safitri, M., Ratnasari, E., Ambarwati, R. 2013. Efektivitas *Steinernema* spp., dalam pengendalian hama serangga tanah pada berbagai tekstur tanah. *Jurnal lentera bio UNESA: Surabaya*.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A, R. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* Vol. 74 (12): 5463-5467.
- Savas, Adiguzel, Inan, Ozkan, Gullece, & Sahin, F. 2009. Molecular Characterization of Thermophilic Bacteria Isolated from Van City Ercis Town Hasanabdal Hot Spring. *Journal Roumanian Biotechnological Letters.* Vol. 14 (3): 5463-5467.

- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ME.
- Schlutzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* 102 (5): 615–23.
- Simoës, N. and Rose, J. R. 1996. Pathogenecity and Host Specify of entomopathogenic Nematodes. *Biocontrol Science and Tecnology*. 6 : 403-411.
- Somvanshi, V.S., Lang, E., Straubler, B., Sproer, C., Schumann, P., Ganguly, S., Anil K. Saxena, A.K., Stackebrandt, E. 2006. *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2006), 56 , 629–633
- Suryanto, D. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekular*. Medan : Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Tsai, Y.L., & B.H. Olson. 1991. Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57:1070-1074.
- Usmle. 2012. Ribosomal RNA as Target. [serial online]. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [08 Mei 2014].
- Vierstraete, A. 1999. Principle of PCR. [serial online]. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [08 Mei 2014].
- Ward, D.M. 1998. A natural species concepts for procaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 1: 271-277.
- Woodring, J, L & Kaya, H, K. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques*. Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas.
- Yamamoto, H., Hiraishi, A., Kato, K., Chiura, H. X., Maki, H., Shimizu, A. 1998. Phylogenetic Evidence for the Existence of Novel Thermophilic Bacteria in

Hot Spring Sulfur-Turf Microbial Mats in Japan. Journal Applied And Environmental Microbiology 64(5):1680-1687.



**Lampiran A. Komposisi Media dan Larutan**

No	Nama Media/Larutan (per 1 L)	Bahan	Komposisi	Ket
1	Media NANR	Nutrien Broth Bacto Agar Neutral Red Akuades	13 gr 14 gr 3 mg 1000 ml	
2	Media NB	Nutrien Broth Akuades	13 gr 1000 ml	
3	Media YS	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O Yeast Ekstrak Akuades	0.5 gr 0.5 gr 0.2 gr 5 gr 1000 ml	
4	Larutan PBS	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Akuades	8 gr 0.2 gr 1.44 gr 0.24 gr 1000 ml	pH = 8.0
5	Larutan TBE 10x	Tris Base Boric Acid EDTA Aquades Steril	108 gr 55 gr 7.44 gr 1000 ml	
6	Gel Agarose 1%	Agarose TBE 1x	10 gr 1000 ml	

**Lampiran B. Sekuen 16S rRNA Utuh Isolat Bakteri Symbion-NEP Lokal Asal  
Bromo Jawa Timur dengan Primer 27F, 907R, 533F dan 1492R**

Sampel	Sekuen	Jumlah pb
1. Isolat CL01	CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGT CGAGCGGTAACAGGGGAAGCTTGCTTCTCGCTGACGAGCG GCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGA GGGGGATAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAAT CTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGAACCTTCGGTCCTTGCGCTA TCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAA TGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA TGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCACAATGGGCGCA AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTA GGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGGGAGGAAGGCGTTGATG CTAATATCATCAACGATTGACGTTACCGACAGAAGAAGCA CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC AGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA CCTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTTGT AGAGGGGGGTAGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGA TGTCGATTTGAAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTTCGGA GCTAACCGGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACC TTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTAGCAGAGATGCTT TAGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTG TCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGLAA CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCGG GAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGG CTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAC CTCGCGAGAGCAAGCGGAACCTATAAAGTACGTCGTAGTC CGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC GCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC CCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG GTTGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGC TTACCACTGTGC	1450 pb
2. Isolat CL01	CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGAAGCTTGC TTCTCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGG	1425 pb

	<p>GGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACCACTGGAAACGGT  AGCTAATACCGCATAATCTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGAA  CTTCGGTCCTTGCCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAG  CTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCT  AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAG  ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT  GTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGTCG  GGAGGAAGGCGTTGATGCTAATATCATCAACGATTGACGT  TACCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC  CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT  GGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGT  GAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATGGCATCTAAGACTG  GTCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTG  TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTG  GCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG  CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA  GTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGAAGGTTGTTCCCTT  GAGGAGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCC  TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA  CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTG  ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGA  ACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCTGAGA  CAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGAAATG  TTGGGTTAAGTCCCACAAGGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT  TGCCAGCGATTCCGGTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGCT  GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA  TGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG  TATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACCT  CATAAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCG  ACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAA  TGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  GTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGC  TTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTGT</p>	
<p><b>3. Isolat NG01</b></p>	<p>AGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAAGTGGTCT  GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCC  AGAATCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAA  TGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCCCCTGTGTGAAGA  AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTCTGTTGGGAGGAAGG  GCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTATTGACGTTACCAACAGA  AGAAGCCCCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  CGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA  GCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCC</p>	<p><b>1203 pb</b></p>



<p>GGGCTCACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAGCTAG AGTACGGTAGAGGGTGGTGGGAATTTCCCGTGTAGCGGTG AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAG TGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTAC GGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC GAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAG AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTG CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAA GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTACCAGCAC CTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC GGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGG GTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGA TCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAG TCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGA ATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG GGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGG GGACGT</p>	
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Lampiran C. Pensejajaran sekuen 16S rRNA Isolat CL01 dan SK01 dengan sekuen 16S rRNA Utuh *Providencia vermicola* Pada Gene Bank

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 CT CAGA TTGAAACGCTGGCGCAGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGAAGTTGGCTTCGTCGACAGCGCGGACCGGTTAGTAATGTA  
 CTCAGATTGAACGCTGGCGCAGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGAAGTTGGCTTCGTCGACAGCGCGGACCGGTTAGTAATGTA  
 -----CCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGGGAAGTTGGCTTCGTCGACAGCGCGGACCGGTTAGTAATGTA

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 TGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGATAACCCACTGGAAAACGGTGGCTAATACCGCATAACTCTTAGGCAAAAGACAGGGAACTTCGGTCCCTTCGGGTAT  
 TGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGATAACCCACTGGAAAACGGTGGCTAATACCGCATAACTCTTAGGCAAAAGACAGGGAACTTCGGTCCCTTCGGGTAT  
 TGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGATAACCCACTGGAAAACGGTGGCTAATACCGCATAACTCTTAGGCAAAAGACAGGGAACTTCGGTCCCTTCGGGTAT

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 CGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTGGGTAATGGCTCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG  
 CGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTGGGTAATGGCTCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG  
 CGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTGGGTAATGGCTCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGAAATATGCAAAATGGGCGCAAGCCCTGATCAGCCCATGCGCCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGG  
 AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGAAATATGCAAAATGGGCGCAAGCCCTGATCAGCCCATGCGCCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGG  
 AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGAAATATGCAAAATGGGCGCAAGCCCTGATCAGCCCATGCGCCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
 GTTTGAAAAGTACTTTTCAGTCCGGGAGGAGCGTTGATGCTAATAATCATCAACGATGGACGTTACCGACAGAAGAAGCACCCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAG  
 GTTTGAAAAGTACTTTTCAGTCCGGGAGGAGCGTTGATGCTAATAATCATCAACGATGGACGTTACCGACAGAAGAAGCACCCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAG  
 GTTTGAAAAGTACTTTTCAGTCCGGGAGGAGCGTTGATGCTAATAATCATCAACGATGGACGTTACCGACAGAAGAAGCACCCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
 CCGCGGTAAATACGGAGGGTCAAAGCGTTAATCGGAAATCTGGGCGTAAAGCGCACGACGGCGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACC  
 CCGCGGTAAATACGGAGGGTCAAAGCGTTAATCGGAAATCTGGGCGTAAAGCGCACGACGGCGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACC  
 CCGCGGTAAATACGGAGGGTCAAAGCGTTAATCGGAAATCTGGGCGTAAAGCGCACGACGGCGTTGATTAAGTTAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACC

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....610 620 630 640 650 660 670 680 690 700  
 TGGGAAATGGCATCTAAGACTGGTCAAGTCTTTAGAGGGGGTAGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGGTG  
 TGGGAAATGGCATCTAAGACTGGTCAAGTCTTTAGAGGGGGTAGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGGTG  
 TGGGAAATGGCATCTAAGACTGGTCAAGTCTTTAGAGGGGGTAGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATGTGGAGAAATACCGGTG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....710 720 730 740 750 760 770 780 790 800  
 GCGAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGGGAAAGCGTTGGGAGCAAAAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATTCG  
 GCGAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGGGAAAGCGTTGGGAGCAAAAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATTCG  
 GCGAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGGGAAAGCGTTGGGAGCAAAAGGATAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAACCGATTCG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 .....810 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
 ATTTGAAAGTGTTCCTTTGAGGAGTGGCTTTCCGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCTGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAAACTCAAAATGAAATGAC  
 ATTTGAAAGTGTTCCTTTGAGGAGTGGCTTTCCGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCTGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAAACTCAAAATGAAATGAC  
 ATTTGAAAGTGTTCCTTTGAGGAGTGGCTTTCCGAGCTAACCGGTTAAATCGACCCTGGGAGTACGGCCCAAGGTTAAAACTCAAAATGAAATGAC

.....910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
 .....

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 GGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATCGAACGCGAAGAACCCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAATTTAGCAGAGATGCTTTGG  
 GGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATCGAACGCGAAGAACCCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAATTTAGCAGAGATGCTTTGG  
 GGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATCGAACGCGAAGAACCCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAATTTAGCAGAGATGCTTTGG

1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGTCGTTGTTGGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAAGCGCAACCCCTTATCCCTTTG  
 TGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGTCGTTGTTGGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAAGCGCAACCCCTTATCCCTTTG  
 TGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGTCGTTGTTGGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAAGCGCAACCCCTTATCCCTTTG

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 TTGCCAGCGATTCGGTTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGAATAAACCGGAGGAAGTGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT  
 TTGCCAGCGATTCGGTTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGAATAAACCGGAGGAAGTGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT  
 TTGCCAGCGATTCGGTTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGAATAAACCGGAGGAAGTGGGATGACGTCGAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT

1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 ACACACGTCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGAACTCATAAAAGTACGTCGTAGTCCCGGATTTGGAGTCTGCCAACTCGA  
 ACACACGTCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGAACTCATAAAAGTACGTCGTAGTCCCGGATTTGGAGTCTGCCAACTCGA  
 ACACACGTCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGAACTCATAAAAGTACGTCGTAGTCCCGGATTTGGAGTCTGCCAACTCGA

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 CTCCTAGAAATCGGAAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAAATGCTACGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTTGACACACCGCCCGTCAACCAATGGGAGTGGGT  
 CTCCTAGAAATCGGAAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAAATGCTACGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTTGACACACCGCCCGTCAACCAATGGGAGTGGGT  
 CTCCTAGAAATCGGAAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAAATGCTACGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTTGACACACCGCCCGTCAACCAATGGGAGTGGGT

1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC

1410 | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC  
 TGC AAAAAGAGT AGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAACAAAGTAAACCGTAGGGGAAACCTGC

P. vermicola pd Gene Bank  
 CL01  
 SK01  
 GGCTGGATCACCTCCTT  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|  
 1510