



**KARAKTERISASI FISILOGI DAN MOLEKULER
BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN
BERDASARKAN SEKUEN GEN PENGKODE 16S rRNA DARI
BROMO KABUPATEN PROBOLINGGO**

TESIS

OLEH
BAGUS SETIAWAN
NIM. 121820401009

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**KARAKTERISASI FISILOGI DAN MOLEKULER
BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN
BERDASARKAN SEKUEN GEN PENGKODE 16S rRNA DARI
BROMO KABUPATEN PROBOLINGGO**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Biologi (S2)
dan mencapai gelar Magister Sains (M. Si.)

OLEH
BAGUS SETIAWAN
NIM. 121820401009

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Tesis ini saya persembahkan untuk :

Istriku tercinta
Nazula Isnaini Arifah (Bunda Lala)

Anak-anakku:

Marchya Jasmine Aqila Gustinia (Chya)

Naura Sabiha Nadine Gustinia (NadNad)

MOTTO

“Berdo’alah kepada-Ku, niscaya akan Ku
perkenankan bagimu.”

(QS. Al Mukmin : 60)

“Ujian hidup tidak selamanya berlaku bagi orang
yang terkuat atau tercepat, tapi cepat atau
lambat orang yang menang adalah orang yang
berpikir bahwa mereka mampu”

“Jika kita tidak bisa menjadi orang pandai, jadilah
orang baik bagi orang lain”

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Bagus Setiawan, S.P.

NIM : 121820401009

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Karakterisasi Fisiologi Dan Molekuler Bakteri Simbion-Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA Dari Bromo Kabupaten Probolinggo”** adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, April 2016

Yang menyatakan

Bagus Setiawan, S.P.
NIM. 121820401009

TESIS

KARAKTERISASI FISIOLOGI DAN MOLEKULER BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN BERDASARKAN SEKUEN GEN PENGKODE 16S rRNA DARI BROMO KABUPATEN PROBOLINGGO

Oleh

Bagus Setiawan, S.P.
NIM 121820401009

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Didik Sulistyanto
Dosen Pembimbing Anggota : Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.

PERSETUJUAN

KARAKTERISASI FISIOLOGI DAN MOLEKULER BAKTERI SIMBION-NEMATODA ENTOMOPATOGEN BERDASARKAN SEKUEN GEN PENGKODE 16S rRNA DARI BROMO KABUPATEN PROBOLINGGO

TESIS

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
Untuk menyelesaikan Program Studi Biologi
Dan mencapai gelar Magister Biologi (M. Si.)

OLEH

Nama Mahasiswa : Bagus Setiawan, S.P.
NIM : 121820401009
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Program Studi : Magister Biologi Sains
Angkatan Tahun : 2012
Daerah Asal : Surabaya
Tempat, Tanggal Lahir: Surabaya, 27 Mei 1974

Disetujui Oleh

Dosen Pembimbing Utama (DPU)

Dosen Pembimbing Anggota (DPA)

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Didik Sulistyanto
NIP. 19640326 198803 1 001

Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP. 19750913 200003 2 001

PENGESAHAN

Tesis berjudul “**Karakterisasi Fisiologi Dan Molekuler Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA Dari Bromo Kabupaten Probolinggo**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Selasa
Tanggal : 19 April 2016
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Didik Sulistyanto
NIP. 19640326 198803 1 001

Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP. 19750913 200003 2 001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc
NIP. 19551022 198212 1 001

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd.
NIP. 19580528 198802 1 002

Mengesahkan,
Dekan FMIPA Universitas Jember,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 19610204 198711 1 001

RINGKASAN

Karakterisasi Fisiologi Dan Molekuler Bakteri Simbion-Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA Dari Bromo Kabupaten Probolinggo; Bagus Setiawan, 121820401009; 2016: 58 halaman; Magister Biologi Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat secara fenotip dan berdasarkan sekuen gen pengkode 16S rRNA pada bakteri simbion nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis sp.*-*Photorhabdus sp.* dan *Steinernema sp.*-*Xenorhabdus sp.* isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo, yaitu isolat Wonokerto dan isolat Sukapura.

Terdapat dua sampel isolat bakteri simbion-nematoda entomopatogen *Steinernema sp.* digunakan sebagai sampel yang merupakan koleksi laboratorium Pengendalian Hayati Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan (HPT), Fakultas Pertanian, Universitas Jember dari daerah Bromo isolat Wonokerto (WN01) dan isolat Sukapura (SP01). Adapun metoda yang digunakan pada penelitian ini adalah : isolasi nematode entomopatogen *Steinernema sp.* dan bakteri simbion, karakterisasi isolat bakteri, isolasi DNA genom, PCR 16S rRNA, pemurnian DNA, dan analisis sekuen DNA.

Hasil uji morfologi bakteri simbion nematoda entomopatogen isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo, yaitu isolat WN01 dan SP01, yang telah murni dan berumur kurang dari 24 jam secara berurutan diamati bentuk dan morfologinya melalui pewarnaan Gram dan hasil yang terlihat secara mikroskopis dengan pembesaran 1000X berbentuk batang pendek Gram positif, karakterisasi fisiologis dengan menggunakan media NANR yaitu positif ditandai dengan penyerapan *Neutral Red* pada media NANR. Berdasarkan hasil karakterisasi isolat bakteri Wonokerto (WN01) dan isolat bakteri Sukapura (SP01) didapatkan hasil bahwa isolat WN01 dan SP01 berwarna putih kekuningan, bioluminescence negative, katalase positif, tidak dapat menghidrolisis urea, dan juga tidak dapat memproduksi H₂S.

Dari hasil penelitian diperoleh sekuen sekuen isolat WN01 memiliki kemiripan dengan bakteri *Bacillus toyonensis* strain BCT 7112, sedangkan isolat SP01 memiliki kemiripan dengan bakteri *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Kata kunci : Bakteri simbion–nematoda entomopatogen, Karakterisasi fisiologis, Sekuen gen pengkode 16S

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. Atas segala rahmat karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Fisiologi Dan Molekuler Bakteri Symbion-Nematoda Entomopatogen Berdasarkan Sekuen Gen Pengkode 16S rRNA Dari Bromo Kabupaten Probolinggo”** Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan program strata dua (S2) pada Program Studi Magister Sains, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr.sc.agr.Didik Sulistyanto, selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr.rer.nat. Kartika Senjarini, selaku Dosen Pembimbing Anggota, Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc, selaku Dosen Penguji I, serta Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd, selaku Dosen Penguji II, yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan tesis ini,
2. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa Magister Biologi Sains, FMIPA, Universitas Jember;
3. Penelitian ini didanai Proyek LPDP-Kemenkeu, Nomor kontrak PRJ-1964/LPDP/2014
4. Semua dosen FMIPA Magister Biologi, atas semua ilmu yang diberikan, bimbingan serta didikan selama menjadi mahasiswa;
5. Teman-temanku seangkatan Magister Biologi 2012, yang telah memberi dukungan, motivasi, kenangan yang terindah;
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tesis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tesis ini dapat bermanfaat.

Jember, April 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
COVER	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian..	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karakterisasi biologis nematoda entomopatogen <i>Heterorhabditis</i> <i>Sp</i>	6
2.2 Karakterisasi biologis nematoda entomopatogen <i>Steinernema</i> <i>Sp</i>	7
2.3 Karakteristik Morfologi Isolat bakteri simbion NEPs secara umum	8
2.4 Identifikasi Secara Molekuler menggunakan PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	10
2.5 Sekuensing.....	13

2.6 Identifikasi Bakteri Berdasarkan 16S rRNA	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.2.1 Alat.....	17
3.2.2 Bahan.....	17
3.3 Prosedur Penelitian	18
3.3.1 Isolasi nematoda entomopatogen bakteri simbion, <i>Heterorhabditis</i> sp. dan <i>Steinernema</i> sp.....	18
3.3.2 Karakterisasi isolat bakteri	19
3.3.3 Isolasi DNA genom menggunakan metode <i>Freeze and Thaw</i>	19
3.3.4 PCR DNA pengkode 16S rRNA.....	20
3.3.5 Purifikasi DNA Hasil PCR.....	21
3.3.6 Analisis Sekuen DNA pengkode 16S rDNA.....	21
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Identifikasi morfologis dan fisiologis Bakteri Simbion- Nematoda isolat WN01 dan SP01	23
4.2 Identifikasi berdasarkan gen pengkode 16S rRNA.....	26
BAB V PENUTUP	35
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	41
AUTOBIOGRAFI	

DAFTAR TABEL

	halaman
4.1 Uji fisiologi untuk karakterisasi isolat bakteri WN01 dan isolat bakteri SP01.....	24
4.2 Spesies Bakteri yang Memiliki Tingkat Kemiripan dengan Isolat Bakteri WN01 dan SP01 Berdasarkan Sekuen Basa Nukleotida DNA Pengkode 16S rRNA pada Gene Bank.....	30

DAFTAR GAMBAR

	halaman
2.4 Bagan Proses Polymerase Chain Reaction	11
2.5 Contoh PAGE sekuensing dengan metode Maxam-Gilbert.....	14
2.5.a Skema sekuensing DNA reaksi polimerisasi dan terminasi	15
2.5.b Skema sekuensing DNA, PAGE untuk melihat ukuran fragmen ..	15
4.1. Morfologi mikroskopis (Mikroskop OLYMPUS perbesaran 1000x)	23
4.1.a Morfologi fisiologis menandakan penyerapan Neutral Red (Kamera SAMSUNG G355M, edit dengan PICASA 39)	24
4.2. Hasil visualisasi Isolasi DNA genom isolat bakteri WN01 dan SP01; M: Marker 1 Kb; 1. WN01; M: Marker 1 kb; 2. SP01 (Kamera SAMSUNG G355M, edit dengan PICASA 39)	27
4.2.a Hasil visualisasi elektroforesis amplifikasi DNA pengkode 16S rRNA isolat bakteri WN01 dan SP01. M: Marker 1 kb; 1,2. Bakteri Symbion WN01 27F-907R,533F-1492R; 3,4. Bakteri Symbion SP01 27F-907R, 533F-1492R (Kamera SAMSUNG G355M, edit dengan PICASA 39)	28
4.2.b Hasil pemurnian produk PCR DNA pengkode 16S rRNA isolat bakteri WN01 dan SP01. M. Marker 1 kb; M: Marker 1 kb; 1,2. Bakteri Symbion WN01 27F-907R,533F-1492R; 3,4. Bakteri Symbion SP01 27F-907R, 533F-1492R (Kamera SAMSUNG G355M, edit dengan PICASA 39)	29
4.2.c Pohon filogeni kedekatan antara isolat bakteri WN01 dengan isolat bak- teri yang terdapat pada GenBank BLAST NCBI	32
4.2.d Pohon filogeni kedekatan antara isolat bakteri SP01 dengan isolat bak- teri yang terdapat pada GenBank BLAST NCBI	34

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran A.	
Komposisi Media dan Larutan Kondisi Umum di Lokasi Pengamatan .	41
Lampiran B.	
Sekuen sampel isolat WN01 dan SP01	41

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengendalian hama dengan memanfaatkan musuh alami merupakan salah satu cara yang dapat digunakan, karena selain efektif terhadap hama sasaran, juga tidak menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan (Chaerani, 2007). Nematoda entomopatogen adalah agens pengendali hayati diantara yang telah diidentifikasi adalah dari famili *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* (Adam & Nguyen, 2002). Nematoda ini membunuh serangga dengan bantuan yang diperoleh dari simbiotik mutualistik dengan bakteri yang dibawa dalam saluran pencernakannya (intestine). (Boemare, 2002). Bakteri ini bersimbiosis secara mutualistik dengan nematoda entomopatogen (NEP). NEP berperan sebagai pembawa bakteri untuk menginfeksi serangga, sehingga apabila serangga mati maka bakteri secara tidak langsung menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan dan produksi NEP. Bakteri bermultiplikasi dan membunuh serangga dengan cara melepaskan beberapa faktor virulensi berupa kompleks toksin insektisidal, protease, lipase, dan lipopolisakarida. serta antibiotik jenis baru maupun antifungi (Bowen *et al.*, 1998; Daborn *et al.*, 2003).

Selama ini 2 spesies bakteri simbion yang berhasil diidentifikasi dari *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* adalah *Photorhabdus sp.* dan *Xenorhabdus.sp.* Bakteri yang bersimbiosis dengan *Heterorhabditis sp.* adalah *Photorhabdus sp.* (Kaya & Gaugler, 1993). Bakteri ini bertanggung jawab untuk membunuh serangga inang secara cepat, dalam 2-3 hari dan menyebabkan septicemia (bakteri masuk kedalam haemocoel, multiplikasi, memproduksi racun dan diikuti kematian serangga). Kematian serangga inang banyak diakibatkan oleh toksin yang dikeluarkan oleh bakteri. Bakteri akan berkembang secara cepat dalam tubuh serangga inang yang telah mati dan menggunakannya sebagai nutrisi (Simoes dan Rosa, 1996). Bakteri *Photorhabdus sp.* mempunyai karakteristik fisiologis antara lain Gram negatif, tidak mempunyai enzim katalase, bioluminensense negatif, memfragmentasi laktosa, pencairan gelatin positif, dan mempunyai aktifitas antibiotik terhadap bakteri lain (Woodring dan Kaya, 1988),

anaerob fakultatif dan non fluorescens (Aguillera *et.al.*, 1993). Bakteri *Photorhabdus sp.* juga menghasilkan enzim lechitinase, protease, entomotoksin (eksotoksin dan endotoksin), DNase, dan phosphatase yang mengakibatkan kematian serangga (Boemare *et.al.*, 1996).

Sementara itu *Xenorhabdus sp.* yang merupakan simbion dari *Steinernema* memiliki bentuk bulat mengkilat menyerupai lendir, cembung, tepi agak rata dengan struktur dalam meneruskan cahaya. Bentuk sekunder bakteri dapat membentuk struktur dalam menyerupai pasir halus dengan meneruskan sinar meskipun benda di bawahnya tidak semua terlihat dengan jelas (Woodring dan Kaya, 1988). Bakteri *Xenorhabdus sp.* terdiri dua fase yang disebut dengan fase primer (fase I) dan fase sekunder (fase II). Fase primer selalu dapat diisolasi dari nematoda *Dauer Juveniles* (DJs) (Ehlers dan Peters, 1995). Menurut Boemare *et al.*, (1996), bahwa bakteri fase primer mempunyai bentuk batang pendek dengan ukuran 80-90 % dibanding batang panjang, serta flagel tersebar pada seluruh sisi sel (pleomorphic).

Penggunaan bakteri sebagai bioinsektisida telah lama diaplikasikan. Salah satu yang banyak digunakan adalah toksin dari *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Bacillus thuringiensis* merupakan salah satu anggota *B. cereus* grup bersama dengan *B. anthrax*, *B. thuringiensis* yang memiliki karakteristik diantaranya memproduksi asam, fakultatis anaerob. *Bacillus thuringiensis* menghasilkan dua macam toksin, toksin utama disebut toksin Cry (*Crystal*) yang dikodekan oleh gen cry. Tipe toksin yang kedua disebut toksin Cyt (*Cytolitic*) yang berfungsi untuk menambah toksin Cry dalam mengontrol insekta (Knowles, BH, 1994). Mekanisme kerja toksin Bt adalah setelah masuk ke dalam perut larva, maka toksin Cry akan pecah dan komponen insektisida akan aktif yang disebut δ -endotoksin (Swadener, 1994). Toksisitas eksotoksin yang dihasilkan *Photorhabdus luminescens* mempunyai spektrum yang lebih luas karena meliputi serangga dari ordo *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Homoptera*, dan *Dictyoptera* (Bowen *et al.*, 1998). Sementara itu bakteri simbion *Xenorhabdus sp.* menghasilkan senyawa antibiotik, lechitinase, bioluminescens (Woodring *et al.*, 1988).

Menurut Marineide, bakteri simbiosis yang diisolasi dari *Steinernema sp.* dibagi menjadi tiga kelompok (Marineide, *et al.*, 1993). Menurut Buchanan dan Gibbons (1974) dalam *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, *B. cereus* termasuk genera basillus, organisme bersel tunggal, berbentuk panjang pendek, biasanya dalam bentuk rantai panjang. Umumnya mempunyai ukuran lebar 1,0 μm –1,2 μm dan panjang 1,0 μm –1,2 μm , Gram positif, aerob, suhu pertumbuhan maksimum 37-48 $^{\circ}\text{C}$ dan minimum 5-20 $^{\circ}\text{C}$ dan pH pertumbuhan 5,5–8,5. *B. cereus* bersifat kosmopolit, suhu pertumbuhan optimum 30 $^{\circ}\text{C}$. *B. cereus* merupakan saprofit ringan yang tidak berbahaya yang lazim terdapat dalam tanah, air, udara, dan tumbuh-tumbuhan serta mampu membentuk endospora yang tahan panas (Jawetz, 1996). 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). *B. toyonensis* strain BCT-7112 T merupakan Gram positif, 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 $^{\circ}\text{C}$, dapat tumbuh optimum pada suhu 35 $^{\circ}\text{C}$. Memiliki kedekatan terdekat dengan kelompok bakteri *Bacillus cereus* (Jiménez *et al.*, 2013).

Identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan metode konvensional dan molekuler. Metode konvensional dapat dilakukan dengan berdasarkan pada karakteristik fenotip yaitu pewarnaan Gram, morfologi dan reaksi biokimia. Namun, metode identifikasi bakteri secara konvensional ini memiliki beberapa kelemahan. Metode 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 dkk., 2003). Karena karakter fisik dan biokimiawi merupakan karakter yang tidak statis dan

berubah karena adanya stress dan evolusi, maka hal ini juga mempengaruhi hasil identifikasi (Ochman *et al.*, 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 di antara spesies yang sama genusnya, dan dapat digunakan sebagai teknik baru untuk identifikasi bakteri pada tingkat spesies (Olsen dan Woese, 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 (May, 1999). Lebih jauh lagi fleksibilitas yang luar biasa membuatnya sangat berarti dalam hal skrining dan identifikasi mikroorganisme.

1.2 Rumusan Masalah

Karakterisasi fisiologi dan molekuler bakteri simbion nematoda entomopatogen dari *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. dari Bromo, Kabupaten Probolinggo, dari wilayah Wonokerto dan Sukapura.

1.3 Batasan Masalah

- a. Identifikasi secara fisiologis berdasarkan karakterisasi fenotip yaitu termasuk pewarnaan Gram, morfologi, uji kultur, reaksi biokimia, dan metode pembiakan *in vivo* pada bakteri simbion, nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. yang diisolasi dari Bromo, Kabupaten Probolinggo.
- b. Identifikasi dan pembuatan pohon filogeni isolat bakteri simbion dari nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. dari

Bromo, Kabupaten Probolinggo dilakukan berdasarkan sekuen DNA gen pengkode 16S rDNA.

1.4 Tujuan Penelitian

- a. Melakukan karakterisasi fisiologis yang ditentukan dengan pewarnaan Gram, morfologi, uji kultur, reaksi biokimia, dan metode pembiakan *in vivo* pada bakteri simbiosis dari nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo.
- b. Identifikasi spesies berdasarkan sekuen gen pengkode 16S rDNA pada bakteri simbiosis dari nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo.
- c. Identifikasi spesies berdasarkan sekuen gen pengkode 16S rDNA pada bakteri simbiosis diluar *Photorhabdus* sp. dan *Xenorhabdus* sp. isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo.

1.5 Manfaat Penelitian

Data yang diperoleh dari karakterisasi fisiologis dan molekuler diharapkan memberikan informasi mengenai identitas bakteri simbiosis nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo dan hubungan filogenetiknya berdasarkan sekuen DNA gen pengkode 16S rDNA.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik biologis nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp.

Pengendalian hayati di dalam konsep dasar Pengendalian Hama Terpadu (PHT) memegang peranan yang sangat penting. Penggunaan agens hayati saat ini memperoleh perhatian yang sangat besar karena bahaya pengaruh samping penggunaan pestisida kimiawi atau senyawa sintetik terhadap lingkungan, baik menimbulkan dampak kekebalan serangga hama tanaman (resistensi), peledakan serangga hama sekunder (resurgensi) dan pencemaran air minum serta makin tingginya kesadaran masyarakat akan kualitas hidup yang baik. Nematoda entomopatogen merupakan salah satu alternatif untuk mengendalikan serangga hama tanpa menimbulkan dampak negatif pada lingkungan. Berkaitan dengan hal tersebut di atas, maka penerapan bioteknologi dalam identifikasi nematoda entomopatogen bakteri simbiosis, *Heterorhabditis* sp. *Photorhabdus* sp. dan *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo sebagai agens pengendali hayati serangga hama sangatlah penting. Sampai sekarang telah diidentifikasi 43 spesies NEP dari dua famili dan tiga genera (Koppenhofer & Fuzi, 2003). 33 spesies dari genus *Steinernema*, satu spesies dari genus *Neosteinernema*, sembilan dari genus *Heterorhabditidae*. NEP ini dapat diisolasi menggunakan larva *greater wax moth* *Galleria mellonella*. NEP dari genus *Steinernematidae* dan *Heterorhabditidae* merupakan parasit yang efisien bagi serangga-serangga yang hidup di tanah atau pada stadia tertentu hidup dalam tanah, memiliki virulensi yang tinggi terhadap inangnya, mematikan (Peters, 1996)

Heterorhabditis adalah genus nematoda dari ordo *Rhabditida*. Semua spesies dari genus ini adalah parasit obligat serangga, dan beberapa digunakan sebagai agen pengendali hayati untuk mengendalikan serangga hama. Nematoda *Heterorhabditis* merupakan host untuk bakteri simbiosis *Photorhabdus*. Kompleks nematoda-bakteri ini dalam lingkungan yang sesuai dapat menjadi agen pengendali hayati yang efektif terhadap hama sasaran. Spesies *Heterorhabditis* sp., membawa satu spesies bakteri simbiosis, *Photorhabdus* sp.. Sel-sel bakteri

Photorhabdus sp., yang dorman disimpan dalam saluran pencernaan *Heterorhabditis* sp.

Klasifikasi *Heterorhabditis* sp. menurut Poinar (1990) sebagai berikut :

Kingdom : *Animalia*
 Filum : *Nematoda*
 Kelas : *Secermentae*
 Ordo : *Rhabditida*
 Famili : *Rhabditidae*
 Genus : *Heterorhabditis*

Heterorhabditis sp. mempunyai bentuk tubuh sebagaimana cacing, silindris, panjang tubuh betina 479 – 700 μm , tubuh jantan 479-685 μm , sedangkan tubuh juvenil infeksi (JI) 479 - 573 μm . Tubuh simetris bilateral, tidak bersegmen-segmen, mempunyai kutikula sehingga tubuhnya licin, gerakannya fleksibel dan tidak ada gerakan kontraktile memanjang. Terdapat alat pencernaan yaitu mulut, esofagus, intestinum, rektum. Betina dewasa *Heterorhabditis* sp. tubuhnya lebih besar dan lebih panjang daripada jantan, pada pertengahan tubuhnya terdapat vulva yang berfungsi untuk kopulasi. Pada bagian kepala terdapat satu mulut dengan enam bibir yang menyerupai gigi dan terdapat satu papilla. Jantan dewasa *Heterorhabditis* sp. tubuhnya lebih kecil dan lebih pendek dari betina, ujung posterior melengkung dan terdapat sepasang spikula sebagai alat kopulasi. Kepala spikula pendek, berasal dari penyempitan lamina dan gubernaculum, berukuran setengah dari panjang spikula.

2.2 Karakteristik biologis nematoda entomopatogen *Steinernema* sp.

Steinernema sp. adalah jenis nematoda entomopatogen yang banyak digunakan sebagai agens pengendali hayati hama. *Steinernema* jantan mempunyai panjang tubuh 1000–1900 μm , lebar 90–200 μm , panjang stoma 4,5–7 μm , lebar stoma 4–5 μm , panjang ekor 19–27 μm , panjang spikula 72–89 μm , gubernaculum 57–70 μm , panjang mucron 2,8–4,5 μm . *Steinernema* betina, panjang tubuh 3020–3972 μm , lebar 153–192 μm , panjang stoma 7–12 μm , lebar stoma 5,0–8,5 μm , panjang ekor 30–47 μm , lebar vulva 49–54 μm . Untuk stadia

‘*Infective juvenile*’ : panjang tubuh 500–570 μm , lebar 15–25 μm , panjang ekor 47–54 μm (Stock, 1993) *Steinernema* sp. Dewasa berukuran besar dan mampu menghasilkan 10000 telur (Weiser, 1991). Nematoda ini mempunyai kulit tubuh yang halus, bentuk kepala tumpul, enam bibir masing-masing mempunyai Guberna dan stoma yang dangkal. *Steinernema* sp. Betina memiliki ovary bertipe amphidelphic yang tumbuh dari arah anterior ke posterior. Vulva terletak pada bagian tengah panjang tubuhnya. *Steinernema* sp. Betina memiliki ovary bertipe amphidelphic yang tumbuh dari arah anterior ke posterior. Vulva terletak pada bagian tengah panjang tubuhnya. *Steinernema* sp. Jantan mempunyai testis tunggal terefleksi, spikula sepasang dengan bentuk kurva simetris ataupun ramping (Gaugler dan Kaya, 1990).

2.3 Karakteristik Morfologi Isolat bakteri simbion NEPs secara umum

Keanekaragaman bakteri dapat dieksplorasi dengan menggunakan karakterisasi fenotip yang meliputi karakter morfologi, fisiologis, dan reaksi biokimia (holt *et al.*, 1994). Pewarnaan gram mempermudah pemeriksaan mikroskopik apusan untuk mengamati bentuk sel bakteri sehingga mudah untuk diidentifikasi dengan cara mengetahui reaksi dinding sel bakteri melalui serangkaian pengecatan. Salah satu tehnik pewarnaan yang dikerjakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember untuk kepentingan identifikasi bakteri adalah pewarnaan Gram, pewarnaan ini membagi sel-sel bakteri ke dalam dua kelompok utama, yaitu Gram-positif dan Gram-negatif. Reaksi pewarnaan Gram didasarkan pada perbedaan komposisi kimiawi dinding sel bakteri. Sel-sel Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal, sedangkan lapisan peptidoglikan pada sel-sel Gram negatif jauh lebih tipis. Pewarnaan Gram menggunakan empat macam pereaksi yang berbeda, yang dibagi menjadi pewarna primer biasanya menggunakan kristal violet, pereaksi peluntur menggunakan lugol-iodine, senyawa pemucat menggunakan etil alkohol 95%, dan terakhir pewarna pembanding menggunakan safranin. (James G. Cappucino, *et.al*, 2014).

Pertumbuhan bakteri sangat tergantung pada ketersediaan nutrisi dan factor lingkungan yang mendukung, media kultur adalah lingkungan yang dibuat untuk membiakkan bakteri didalam laboratorium dengan tujuan mengetahui identitas bakteri sehingga bisa didapatkan biakan bakteri yang murni. koloni bakteri pada media selektif NANR, uji gram, uji bioluminenscene, uji katalase, uji hidrolisis urea, uji produksi H₂S. Pewarnaan gram dilakukan dengan menempatkan

Reaksi biokimia aerobik bakteri yang berasal dari karbohidrat dapat berupa penggunaan sumber energi dari glukosa, laktosa, galaktosa, maltose, dan manitol, selanjutnya reaksi biokimia anaerobik yang biasa dikenal sebagai proses fermentasi menggunakan fermentasi glukosa, enzim δ -galactoside, dan triple sugar iron. Bakteri simbion nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis* sp. *Photorhabdus* sp., *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. dan bertujuan untuk melihat morfologi secara mikroskopik dan sifat Gram dari bakteri simbion nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis* sp. *Photorhabdus* sp. *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. Morfologi dan uji kultur pada bakteri simbion nematoda entomopatogen, *Heterorhabditis* sp. *Photorhabdus* sp., *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. diisolasi dari ulat hongkong (*Tenebrio molitor*) yang terinfeksi oleh nematoda patogen serangga isolat dari Bromo, Kabupaten Probolinggo. Isolasi dilakukan dengan media NBTA (*Nutrient Bromthymol Blue Triphenyltetrazolium Chloride Agar*) untuk mendapatkan koloni bakteri *Photorhabdus* sp. dan *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. fase primer 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).

Perbanyak nematoda entomopatogen *Heterorhabditis* sp. dan *Photorhabdus* sp. dan *Steinernema* sp. *Xenorhabdus* sp. menggunakan metode kultur *in vivo* berdasarkan *white trap* (White, 1927), yang mengambil keuntungan dari munculnya keturunan infeksiif juvenile yang migrasi secara alami dari host

yang mati. Pendekatan ini terdiri dari inokulasi, panen, konsentrasi, dan dekontaminasi.

2.4 Identifikasi Secara Molekuler menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

PCR adalah suatu teknik amplifikasi fragmen DNA yang diinginkan secara *in vitro*, yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Menurut Bednarski 2006, tehnik molekuler yang telah berkembang untuk menganalisis suatu mikroorganisme melalui asam nukleatnya adalah menggunakan tehnik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan suatu tehnik amplifikasi potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20–40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton dan Graham, 1994).

Terdapat beberapa tahapan dalam PCR (*Polymerase Chain Reaction*) :

1. Tahap denaturasi (pemisahan)

Pada tahap ini, temperatur dinaikan pada suhu mendekati titik didih, yaitu 90° – 95° C. Hal ini dilakukan dengan tujuan *double strand* DNA akan terpisah sebagian, yang nantinya berfungsi untuk menyisipkan primer. Waktu yang digunakan biasanya tidak lama, sehingga memungkinkan DNA untuk dapat kembali ke bentuk *double helix*.

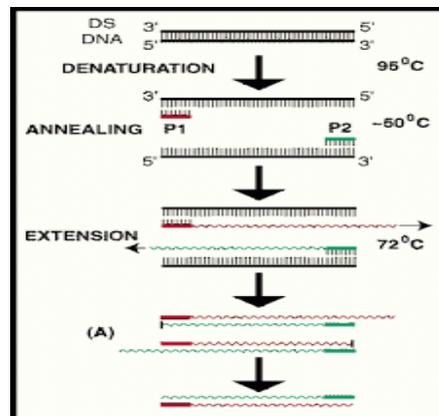
Tambahan DNA kembali lagi ke posisi *double helix* karena adanya ikatan hidrogen pada masing-masing basa DNANYA, sehingga dengan penurunan suhu, DNA akan saling berikatan kembali.

2. Tahap *annealing* (penempelan)

Ketika suhu diturunkan di sekitar suhu 50°C - 65°C , DNA mulai berikatan kembali. Pada saat inilah kesempatan dari primer untuk menyerang posisinya, sehingga akan terbatas jumlah penempelan dari DNA awal. Suhu *annealing* ini berbeda-beda untuk masing-masing proses PCR, ini bergantung pada T_m masing-masing primer yang digunakan. Apabila suhu tidak tepat akan menyebabkan tidak terjadinya penempelan pada daerah spesifik atau primer akan menempel di sembarang tempat, sehingga DNA polimerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak bisa putus apabila dilakukan reaksi polimerase pada suhu 72°C .

3. Tahap *extension* (polimerase/perpanjangan)

Tahap ini disebut juga tahap perpanjangan. Dengan bantuan enzim *Taq Polymerase*, DNA baru disusun dengan menggunakan dNTP sebagai bahan baku. *Taq polymerase* ini membutuhkan kation bivalen dalam aktifitasnya, biasanya menggunakan MgCl_2 sebagai kofaktornya.



Gambar 2.4. Bagan Proses *Polymerase Chain Reaction*

Dalam suatu proses PCR dibutuhkan asam nukleat sebagai sumber informasi genetik, yang secara kimia merupakan suatu rangkaian dari unit yang lebih kecil yaitu nukleotida yang dibentuk oleh *ribose*, *deoxyribose*, *phosphate*, dan basa (*adenin*, *guanine*, *cytosine*, *thymine* untuk DNA dan *urasil* sebagai pengganti *thymine* untuk RNA). Pada umumnya DNA yang

digunakan pada proses PCR adalah DNA total atau DNA genom yang diekstraksi dari sel.

Beberapa komponen yang digunakan dalam pengerjaan PCR :

1. *Taq DNA polymerase*, bersifat termostabil dari bakteri termofilik sampai temperatur 95°C , sehingga tidak rusak pada tahap denaturasi, dan hanya ditambahkan pada awal proses amplifikasi.

Penggunaan *Taq DNA polymerase* akan meningkatkan spesifitas PCR, karena sintesis DNA dilakukan pada temperatur 72°C . Pada temperatur tinggi ini, penempelan non-spesifik antara primer dengan template DNA lebih jarang terjadi, sehingga produk PCR dengan menggunakan *Taq DNA polymerase* lebih spesifik.

2. dNTPs (deoksiribonukleosida trifosfat)), digunakan dalam sintesis DNA meliputi deoksiadenosin trifosfat (dATP), deoksiguadin trifosfat (dGTP), deoksisitidin trifosfat (dCTP), dan deoksitimidin trifosfat (dTTP). dNTP menempel pada gugus 3'-hidroksil bebas primer dengan membentuk untai baru yang komplemen dengan rantai DNA template. Konsentrasi optimal dNTP harus dioptimasi dan tergantung pada konsentrasi MgCl_2 , kekuatan reaksi, konsentrasi primer, panjang produk yang diamplifikasi, dan jumlah siklus PCR.
3. Kation Bivalen (MgCl_2) dan buffer PCR, buffer untuk *Taq DNA polymerase* menggunakan kekuatan 10X dan harus diencerkan 1:10 (v/v) sebelum digunakan. Untuk mencapai kondisi optimum, konsentrasi MgCl_2 dalam campuran akhir dapat bervariasi pada kisaran 0,5-5 mM. Sehingga ion Mg akan membentuk kompleks yang terlarut dalam dNTP yang berperan dalam proses penggabungan. Ion Mg ini bersifat stimulan terhadap aktivitas polimerase, meningkatkan T_m untai ganda DNA dan berinteraksi dengan template. Konsentrasi MgCl_2 yang rendah berpengaruh terhadap penurunan perolehan produk PCR, dan sebaliknya apabila konsentrasi yang tinggi akan mengakibatkan akumulasi produk PCR non-spesifik.

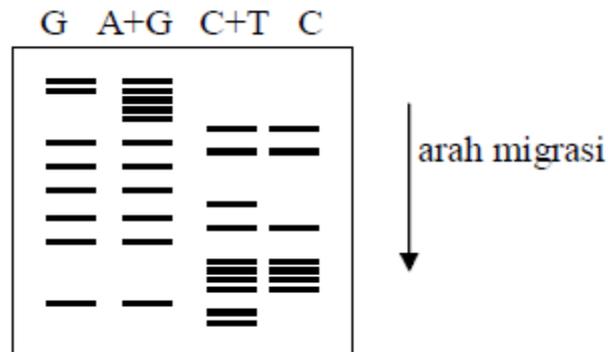
4. Template DNA, sampel PCR bisa berupa DNA untai tunggal atau ganda, ukuran DNA tidak menjadi masalah, amplifikasi sebaiknya jika DNA genom berukuran besar dipotong terlebih dulu dengan enzim restriksi.
5. Sepasang Primer, pemilihan urutan primer ditentukan oleh panjang oligonukleotida, T_m , komposisi nukleotida, karakter fisik, dan interaksi primer-primer (pembentukan dimer-primer). Panjang primer ditentukan oleh konservasi urutan, ukuran, dan komposisi urutan target. Pada umumnya ukuran primer antara 15-30 pb, panjang primer mempengaruhi kemampuan sistem untuk mentoleransi *missmatch*.

2.5 Sekuensing

DNA sekuen digunakan untuk menentukan sekuens nukleotida dalam molekul DNA yang dimulai dari basa nitrogen tertentu dalam untaian DNA dan diakhiri pada basa nitrogen tertentu pula dalam untaian DNA. Menurut Gaffar (2007), DNA menyimpan informasi genetik dalam bentuk urutan nukleotida, urutan nukleotida yang telah diketahui dapat ditentukan urutan asam amino protein yang dikodenya, sedangkan urutan asam amino protein tidak dapat memberikan informasi lengkap mengenai urutan nukleotida gen yang mengkodonya.

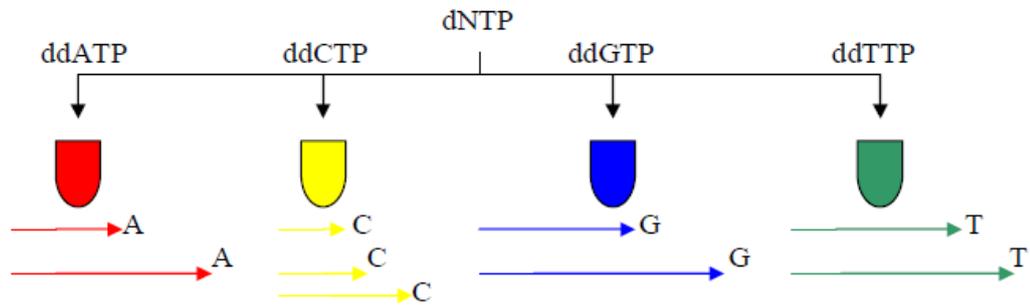
Metode sekuensing yang umum digunakan adalah metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger. Pada metode Maxam-Gilbert (metode kimia) sejumlah DNA yang di digesti oleh enzim restriksi endonuklease, sehingga memisahkan DNA untai tunggal melalui beberapa perlakuan kimia yang memisahkan molekul DNA dan menyusunnya menjadi fragmen-fragmen berdasarkan perbedaan urutan jumlah pasang DNA. Fragmen-fragmen tersebut kemudian dibagi menjadi empat bagian yaitu, T, C, G, A, dan dielektrolisis untuk dideteksi dengan menggunakan *autoradiography*. Keempat kombinasi basa yaitu A, G+A, C, T+C dibandingkan untuk mengetahui basa-basa yang terdapat pada fragmen dan menentukan susunan basanya. Zat kimia yang digunakan dalam reaksi ini adalah zat dimetilsulfat (DMS) yang berfungsi dalam reaksi untuk memotong basa purin

dan mengikat adenin, sedangkan untuk memotong sitosin maupun timin digunakan *hydrazine* (Maxam-Gilbert, 1977).

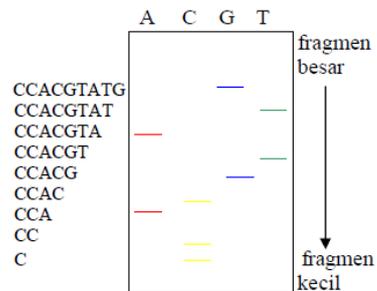


Gambar 2.5. Contoh PAGE sekuensing dengan metode Maxam-Gilbert

Pada metode terminasi rantai atau dideoksi pada metode Sanger, mengacuh pada terminasi prematur dari sintesis DNA yang menghasilkan *chain-terminating dideoxynucleotides*, yaitu tidak ada 3'-hidroksil deoksiribosa dalam reaksi DNA polimerase. Sintesis DNA yang terinisiasi oleh primer menghasilkan empat reaksi yang terpisah yang berjalan serempak. Tiap reaksi mengandung satu dideoksinukleotida (A, C, G, T), pada tahap selanjutnya akan menghentikan sintesis DNA. Hal ini terjadi karena tidak ditemukannya grup 3'-hidroksil untuk penambahan nukleotida berikutnya, sehingga dihasilkan seri dari molekul DNA berlabel yang tiap serinya mengalami terminasi pada basa yang dipresentasikan oleh dideoksinukleotida. Faktor-faktor tersebut dipengaruhi oleh penggunaan enzim restriksi untuk memotong DNA menjadi fragmen-fragmen, pensintesisan untai DNA yang berkomplemen dengan fragmen yang direstriksikan, penggabungan modifikasi nukleotida yang berfungsi menghalangi sintesis DNA, dari hasil proses tersebut kemudian dielektroforesis untuk memisahkan fragmen berdasarkan panjangnya, kemudian dibandingkan satu sama lainnya (Sanger *et al.*, 1977).



Gambar 2.5.a. Skema sekuensing DNA reaksi polimerisasi dan terminasi



Gambar 2.5.b. Skema sekuensing DNA, PAGE untuk melihat ukuran fragmen

Teknik elektroforesis digunakan untuk mengetahui ukuran dan jumlah pasangan basa yang terdapat pada suatu sekuens DNA tertentu. Dalam prosesnya menggunakan label pada fragmen-fragmen DNA untuk meningkatkan daya fluoresensi dari DNA sehingga bisa terlihat jelas, dan menggunakan pewarna untuk fragmen-fragmen DNA pada gel, sedangkan marker digunakan untuk penanda posisi pasangan basa dari molekul DNA yang bermigrasi.

Metode Maxam-Gilbert dan metode Sanger memiliki perbedaan, yaitu pada metode Maxam-Gilbert melibatkan degradasi kimia dari DNA asli, sedangkan pada metode Sanger melibatkan sintesis untai tunggal DNA template menjadi untai ganda dengan bantuan DNA polimerase. Metode sekuens Sanger ini sering digunakan pada saat ini karena memiliki kelebihan antara lain memiliki susunan basa yang lebih lengkap dari DNA template dan menggunakan bahan yang relatif mudah didapatkan walaupun proses pengerjaannya lama dan kurang ekonomis.

2.6 Identifikasi Bakteri Berdasarkan 16S rRNA

Identifikasi dapat dilakukan melalui penentuan 16S rDNA (gen 16S rRNA) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) sekuensing. Segmen 16S rDNA bakteri diamplifikasi melalui PCR, lalu urutannya ditentukan melalui sekuensing. Urutan basa dari 16S rDNA tersebut dibandingkan dengan berbagai urutan 16S rDNA dari berbagai organisme prokariot pada *gene bank*. Perbandingan urutan 16S rDNA juga merupakan cara untuk mengetahui filogenetik dan evolusi diantara berbagai organisme prokariot, karena gen ini mengandung sekuen urutan DNA yang sangat terkonservasi (*highly conserved sequence patterns*) (Innis *et al.*, 1990).

Analisis produk PCR sangat penting dalam mengoptimalkan kondisi PCR untuk menghasilkan produk yang dapat diandalkan dan akurat, dan dalam menafsirkan tingkat produk yang dihasilkan, misalnya, dalam konteks diagnostik. Kondisi PCR, terutama jika mereka menjadi bagian dari rutinitas *high throughput* prosedur penyaringan. Primer dirancang untuk mengikat daerah sekuen yang terkonservasi dan memperkuat daerah variabel. Urutan DNA pada gen 16S rDNA telah ditentukan untuk sejumlah besar spesies. Bahkan, tidak ada gen lain yang telah juga ditandai sebagai spesies lain.

Skrining bakteri menggunakan teknik sekuens 16S rDNA merupakan suatu teknik dalam mengidentifikasi suatu spesies organisme. Teknik ini dilakukan dengan menganalisa struktur atau susunan basa DNA yang terdapat di daerah 16S DNA. Identifikasi ke tingkat spesies dimungkinkan apabila urutan 16S rDNA 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 (May, 1999).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Desember 2013 di Laboratorium Pengendalian Hayati Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan (HPT) FAPERTA dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember. Sekuensing DNA dilakukan di lembaga sekuensing 1st Base Singapura.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat utama dalam melaksanakan penelitian ini diantaranya *Thermal block PCR*, mesin elektroforesis, *UV illuminator*, inkubator, neraca, pH meter, sentrifuse, *vortex-mixer*, *autoclave*, *laminar air flow*, *hot plate stirrer*, *waterbath shaker*, *freezer*, *petridish*, ose, *beaker glass*, erlenmeyer, tabung reaksi, bunzen, gelas ukur, mikrotube 1,5 ml dan 2 ml, mikropipet, tip, kain kassa untuk membuat kantong serangga, bak untuk tempat mencampur tanah, stoples kaca, botol spesimen.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan antara lain adalah media NB (*Nutrient Broth*), media NBTA (*Nutrient Brom Thymol Agar*), media *yeast salt*, ringer's, air, karet gelang, kertas saring, PBS (*Phospat Buffer Saline*), EtBr (*Ethidium Bromide*), buffer TBE (*Tris Boric EDTA*) 10X, 1% agarose, aquabides steril, *loading dye*, 2X PCR Master mix, 2,5 µl primer BOX PCR, 1,25 µl *forward primer* 27F dan 533F (5pmol/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 1 kb, sebagai marker, 200 µl buffer NT, 700 µl buffer NT3, 15-50 µl buffer NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5), bakteri simbion, *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp.

3.3 Prosedur Penelitian

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini ada 2 isolat koleksi dari Laboratorium Pengendalian Hayati Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan FAPERTA, Universitas Jember yang merupakan bakteri simbion-nematoda entomopatogen *Steinernema* sp. dari Bromo, Kabupaten Probolinggo daerah Wonokerto (WN01) dan Sukapura (SP01).

3.3.1 Isolasi nematoda entomopatogen bakteri simbion, *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp.

Teknik yang akan digunakan adalah metode perangkap White (White trap). Nematoda entomopatogen (NEP) seperti nematoda yang lain mempunyai habitat di tanah, oleh sebab itu NEP ini dapat diisolasi dari tanah dengan metoda white trap. Serangga yang digunakan sebagai umpan adalah *Greater wax moth larva Galleria mellonella*. Perbanyakan nematoda juga dilakukan secara in vivo dalam tubuh larva instar akhir ulat lilin (*wax moth*) *Galleria mellonella* (Poinar, 1979; Woodring & Kaya, 1988). 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. sebanyak 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 air/larutan formalin 0.1% setinggi setengah tinggi cawan petri. Setelah 5-6 hari maka juvenil infeksi akan terperangkap dalam air dan siap untuk dipanen.

Metode isolasi nematoda entomopatogen bakteri simbion, *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. dilakukan dengan metode Akhurst (1980), yaitu nematoda entomopatogen bakteri simbion, *Heterorhabditis* sp. dan *Steinernema* sp. dari Bromo, Kabupaten Probolinggo, diinokulasikan pada larva *Galleria mellonella*. Diinkubasikan selama 48 jam atau sampai serangga mati dan pada jenis *Heterorhabditis* menunjukkan larva yang mati akan berwarna kemerahan. Isolasi bakteri simbion dilakukan langsung dari larva *Galleria melonella* yang telah

terinfeksi nematoda entomopatogen. Sterilisasi permukaan larva yang terinfeksi nematoda dilakukan dengan menggunakan alkohol 95% selama 15 menit, dibilas tiga kali dengan aquadest steril, kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril. Bagian tungkai larva *Galeria melonella* yang telah mati dipotong dengan pisau bedah steril dan cairan haemolympha yang keluar dari tubuh larva digoreskan pada media *Nutrien Brom Thymol Agar*. Media diinkubasi pada suhu 25°C selama 24-48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh di media NBTA dibiakkan pada media YS cair, diinkubasikan selama 24 – 48 jam dalam ruang gelap pada suhu kamar, dan dikocok secara terus-menerus menggunakan *shaker*. Bakteri simbion yang diperoleh, dimasukkan dalam mikrotube volume 2 ml yang sebelumnya telah diisi dengan gliserin steril, selanjutnya disimpan dalam *freezer* suhu -25°C (Kaya dan Stock, 1997).

3.3.2 Karakterisasi isolat bakteri

Karakterisasi fisiologi yang dilakukan yaitu melihat warna satu ose isolat bakteri dari stok kultur 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 H₂O₂ 3% pada gelas objek. Diamati segera apakah timbul gelembung-gelembung gas sampai jangka waktu 5 menit setelah pencampuran dengan H₂O₂ 3%. Tes urease dilakukan dengan menginokulasi bakteri resisten ke media padat urea Christensen, tes positif ditandai dengan terbentuknya warna merah. Tes produksi H₂S dilakukan dengan menginokulasi bakteri resisten ke media SIM (pepton 30 g/L, ekstrak daging 3 g/L, feroamonium sulfat 0,2 g/L dan natrium tiosulfat 0,025 g/L, agar 3 g/L). Tes positif ditandai dengan terbentuknya endapan hitam.

3.3.3 Isolasi DNA genom menggunakan metode *Freeze and Thaw*

Koloni tunggal dari media NBTA ditumbuhkan pada media YS cair dan diinkubasi pada inkubator *shaker* selama 16 jam pada suhu ruang (30°C). Kultur

cair yang tumbuh diambil 1.000 µl dan masukkan ke dalam mikrotube dan sentrifuse selama 5 menit, 4°C, 13.000 rpm, kemudian ambil peletnya. Ulangi 3 kali. Pelet yang telah diperoleh cuci dengan PBS 3X1000µl, kemudian sentrifuse selama 5 menit, 4°C, 13.000 rpm. Pelet yang diperoleh disimpan didalam suhu -20°C, selama 24 jam untuk diekstraksi DNA genom.

DNA genom diekstraksi dengan mendidihkan pelet yang beku selama 4 menit, kemudian larutkan dengan 50 µl aquabidest steril dan diresuspensi. Suspensi tersebut disentrifuse selama 5 menit, 4°C, 13.000 rpm. Supernatan yang diperoleh adalah materi genetik dan jika tidak segera digunakan untuk PCR genom simpan pada suhu -20°C.

Uji kualitas DNA genom dengan menggunakan elektroforesis selama 60 menit pada 80 volt, dengan kondisi *running* tambahkan 1µl *loading dye* untuk 5µl supernatan DNA genom, masukkan ke dalam sumuran gel agarose 1% yang mengandung EtBr dan sebagai *running buffer* adalah *buffer* TBE. Sebagai marker digunakan DNA *ladder* 1 kb, setelah 60 menit gel bisa divisualisasikan pada UV iluminator untuk melihat fragmen-fragmen DNA genom.

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 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). PCR dilakukan dengan mereaksikan 15 µl aquabidest steril, 25 µl 2x PCR Master Mix (Qiagen Kit), 1,25 µl forward primer (10 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl), 1,25 µl reverse primer (10 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25pmol/µl) dan 2 µl ekstrak DNA. Gradien temperatur yang digunakan yaitu *initial denaturation* 94°C selama 5 menit; 9 siklus 94°C selama 1 menit, 56°C selama 1 menit, dan 72°C selama 1 menit; 24 siklus 94°C selama 1 menit, 53°C selama 1 menit, dan 72°C selama 1 menit serta *final extension* pada 72°C selama 10 menit. Sebelum sekuensing kualitas DNA dari produk PCR dilihat melalui elektroforesis. DNA *ladder* 100 bp digunakan sebagai *marker*. 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 GelExtraction 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 mikro tube 1,5 ml dan ditambahkan 200 µl buffer NT. Sampel diinkubasi selama 5-10 menit pada 50⁰C kemudian divortex dengan kuat sampai potongan gel tersebut bisa bercampur. Sampel dimasukkan dalam kolom *NucleoSpin Extract II* yang sebelumnya telah ditempatkan pada tabung koleksi (2 ml). Sentrifugasi dilakukan pada 11.000x g selama 1 menit sehingga cairan pada kolom akan pindah ke tabung koleksi. Cairan pada tabung koleksi di buang 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 11.000x g selama 1 menit sampai semua buffer pindah ke tabung koleksi. Cairan pada tabung koleksi di buang dan kolom *NucleoSpin Extract II* ditempatkan kembali pada tabung koleksi. Sentrifugasi dilakukan kembali pada 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 70⁰C. 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 rDNA

Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk PCR dilakukan di lembaga sekuensing 1st Base Singapura. Bioedit software (Tom Hall, Ibis Therapeutics) digunakan untuk analisis data kasar hasil sekuensing. Setelah diketahui *alignment*

sekuen DNA pengkode 16S rRNA dari masing-masing isolat maka sekuennya dibandingkan dengan database gen 16S rDNA menggunakan BLAST *online software* (www.ncbi.nlm.nih.gov.) untuk menentukan spesies dari isolat dan hubungan kekerabatan dengan spesies bakteri lainnya.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil identifikasi morfologi dan biokimiawi menunjukkan bahwa isolat WN01 dan SP01 memiliki bentuk sel basil, berwarna putih kekuningan, keduanya Gram positif, Bioluminiscence negatif, katalase positif, tidak dapat menghidrolisis urea, dan juga tidak dapat memproduksi H₂S. Hasil karakterisasi secara fisiologi yang dilanjutkan dengan hasil analisis DNA pengkode 16S rRNA, menunjukkan bahwa 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%.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian perlu dipertimbangkan dalam perolehan data sequencing disarankan dilakukan pengulangan tiga kali, untuk menghindari kesalahan interpretasi hasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, B. J., and Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and systematics. Pp 1–34 in R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic Nematology*. New York, NY: CABI
- Aguillera, M.M., N.C. Hodge, R.E. Stall and G.C. Smart, Jr. 1993. Bacterial Symbionts of *Steirnernema scaptrisci*. *Invert. Pathol.* 62 : 68-72
- Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes Neoaplectana and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology* 121:303–309.
- Boemare, N. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*, 2002. p.35-56.
- Boemare, N.E., Lanmond and Mauleon, H. 1996 The entomopathogenic nematodes *Bacterium complex*, biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 333-346
- Bowen DJ and JC Ensign. 1998. Purification and characterization of a High-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3029-3035.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. Eight Edition. The Williams and Wilkins Company/Baltimore.
- Chaerani, Y. Suryadi, T.P. Priyatno, D. Koswanudin, U. Rahmat, Sujatmo, Yusuf, dan C.T. Griffin. 2007. Isolasi nematoda patogen serangga *Steirnernema* dan *Heterorhabditis*. *JHPT Tropika* 7(1):1-9
- Daborn P.J., Waterfield NR, AJ Dowling, G Yang, M Hares and RH Ffrench-Constant. 2003. The insecticidal insect protein but show no juvenile hormone esterase toxin makes caterpillar floppy 2 (Mcf2) show activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 229,265-270.
- Ehlers, R.U., dan A. Peters, 1995. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control : Feasibility, Perspectives and Possible Risks*. *Biological Control : Benefit and Risks*. Cambridge University Press. Cambrid. 119-136pp.

- Frank, Reisch, Sharma, Weisbeum, Wilson, dan Olsen. 2008. Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial 16S rRNA Genes. *Applied and Enviromental Microbiology*. Vol. 74(8): 2461-2470.
- Gaugler, R. and Kaya, H.K. (1990) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Head, J., Lawrence, A. J., and Walters, K. F. A. 2004. Efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against *Bemisia tabaci* in relation to plant species. *Journal of Applied Entomology* 128:543–547
- Heimpel. AM. and A.I Angus. 1963. Disease Caused by Certain Sporeforming Bacteria. In E.A. Steinhaus (Eds) *Insect Pathology and Advanced Trastise* Vol. 2; Academic Press, New York.
- Hidayati, W. 2013. Teori Dan Praktikum Sistematika Mikroba Serta Analisis Bioinformatika. *Diversitas Mikroba*. RSPTI Universitas Airlangga. Hal. 75
- Holt G, Kreig NR, Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST, 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williamn and Wilkins Baltimore.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Slnnsky, J.J., White, T.J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York
- James G. Cappuccino, Natalie Sherman. Published by Benjamin Cummings. 2014. *Microbiology: A Laboratory Manual* is known for its thorough coverage, 10th edition - mypearsonstore
- Jawets, E, *et al*, *Review of Medical Microbiology*, 14th ed, Lange Med.Pub.Mauren Asian Edition, Singapura, 1996
- Jiménez *et al* 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(6):383-91. doi: 10.1016/j.syapm.2013.04.008. Epub 2013 Jun 19.
- Kaya, H. K. & R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kaya, H.K.; Burlando, T.M.; Thruston, G.S. Two entomopathogenic nematode species with different search strategies for insect suppression. *Biological control*, v.22, n.4, p.859-864, 1993.

- Khetan, S.K. 2001. Microbial Pest Control. <http://www.cplbookshop.com/contents/C155.htm>
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. In *Advances in Insect Physiology*, Vol. 24 (ed. P.D. Evans). Academic Press, London. p. 275-308
- Koppenhöfer, A.M. & Fuzi, E.M. 2003. *Steinernema scarabei* for the control of white grubs. *Biological Control*, 28:47-59
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. New York: Wiley
- Lelliot dan Stead. 1987. *Methods For the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plant*. Oxford. Blackwell Sci. Publ.
- 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.
- Marineide M. Aguilera, et al, Bacterial Symbionts of *Steinernema scapterisci*. 1993. *Journal of Invertebrate Pathology*. Academic Press, Inc. 62, P. 68-72.
- Maxam AM and Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 560–564.
- Newton, C.R. and A. Graham. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher
- Ochman, H. and S. R. Santos. (2005). Exploring microbial microevolution with microarrays. *Infect. Genet. Evol.* 5:103-108.
- Olsen, G. J. & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7, 113-123.
- Parry, J.M., P.C.B. Turnbull dan J.R. Gibson. 1983. *A Colour Atlas of Bacillus Species*. Wolfe Medical Publication Ltd

- Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. And their impact on insect populations. *Biocontrol Science & Technology* 6, 389-402.
- Poinar, G.O. (1990) Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. *Entomopathogenic Nematodes in biological Control of Insect*. CRC Press. Boca Raton. Florida. P. 23-60.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Micklen S, and Coulson AR. 1977. DNA sequencing and chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463–5467
- Senewe, *et al.* 2012. The Used of *Bacillus cereus* Bacteria Entomopathogenic Pest *Spodoptera litura* on Plant Cabbage. *Eugenia* Vol. 18, No 2.
- Simoës, N. and Rosa, J.S. (1996) Pathogenecity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 6 : 403-412.
- Stock, P. (1993) *Description of Argentinian Strain of Steinernema sp. (Nematoda : Steinernematidae)*. *Nematol. Medit. Buenos Aires. Argentina*. 21 : 279 – 283.
- Sulistyanto, D. (1999) Nematoda Entomopatogen, *Steinernema* spp. dan *Heterorhabditis* spp. Isolat Lokal sebagai Pengendali Hayati Serangga Hama Perkebunan. *Makalah Lustrum Universitas Jember, 2 Desember 1999*. Jember. 12 hal.
- Suryanto, D. 2003. Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekular. Medan : Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Swadener, C. 1994. *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Pesticides Reform* vol. 14, No 3: 13-20. Northwest Coalition for Alternative to Pesticides. Ottawa.
- Thomas, G.M. & Poinar, G.O. Jr. (1979). *Xenorhabdus gen. nov.*, a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 352-360.
- Trivedi, P.C., Pandey, S., & Bhadauria, S. (2010). *Text Book of Microbiology*. Aaviskhar Publisher. 457 p.

- Weiser, J. (1991) *Biological Control of Vectors Manual for Collecting, Field Determination and Handling of Biofactors for Control Vectors*. John Willey and Sons. Chichester. England.
- Woodring, J.L. and Kaya. (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A Handbook of Technique. Arkansas Agric.Expt. Stst. Fayetteville. Arkansas.30 p.
- 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*; 41(5): 1996–2001
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66:302–303.

DAFTAR LAMPIRAN

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 ₄ H ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O Yeast Ekstrak Akuades	0.5 gr 0.5 gr 0.2 gr 5 gr 1000 ml	
4	Larutan PBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ 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 sampel isolat WN01 dan SP01

No	Sekuen	Sampel
1	<p>AGACTGCATACAGGAGAGCAAGGCAGTAGGGAATCTTCACTGCAAACAGGACGAAAGTCTGACGGAGCAGCGCCGCGT GAGTGATGAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACG GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTA TTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACAC CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCCACCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTATGCTGAAGTAAACGCATTAAGC ACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGAGCATGT GGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTGATCTTAGTGGCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGA GGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGTAGTA ATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCCCGCTCACACCACGAGAGTTTGTAAACAC CCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTGAGCCAGCCGCTAA</p>	<p>WN01 dengan 1140 pasang basa</p>
2	<p>GCTAAATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGT AACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATCCGGATAACATTTTGAACCTGCATGGTTCGAAA ATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGCACTTATGGATGGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAACC AAGGGCAAACGATGTGTAGCCCGACCTGAGAAGGGTATCGGGCCACTGGGAACTGAGACACGGNCCCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGCCTT CGGGTCGTAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCCTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC GCGCAGGTGGTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGT GCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGA CTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGTGAGTAACGCATAAGCACTCC</p>	<p>SP01 dengan 849 pasang basa</p>



AUTOBIOGRAFI

Bagus Setiawan, A.Md., S.P.

Lahir di Surabaya, 27 Mei 1974.

Menamatkan pendidikan Sekolah Dasar dari SDN Airlangga IV Surabaya pada tahun 1987, kemudian melanjutkan ke SMPN 6 Surabaya dan lulus pada tahun 1990. Pendidikan Sekolah Menengah Atas ditempuh di SMAN 10 Surabaya dan lulus pada tahun 1993. Lulus D3 Analis Medis, Fakultas Kedokteran, pada tahun 1996 dan S1 Pertanian pada tahun 2007.

Bekerja sebagai Analis Medis semenjak tahun 1996 – sekarang.