

Draft Genome of *Lysinibacillus sphaericus* Isolate 229C Pathogenic to Vector Mosquitoes

Afiannisa Viersanova¹ & Hari Purwanto^{1*}

¹Departemen Biologi tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

Article History

Received : July 02th, 2021

Revised : July 13th, 2021

Accepted : July 15th, 2021

Published : July 18th, 2021

*Corresponding Author:

Hari Purwanto,

Departemen Biologi Tropika,
Fakultas Biologi, Universitas
Gadjah Mada, Yogyakarta,
Indonesia.

Email:

hari.purwanto@ugm.ac.id

Abstract: *Lysinibacillus sphaericus* is widely known as a bioinsecticide agent because it shows entomopathogenic activity against vector mosquitoes, especially of *Culex* and *Anopheles* spp. This bacterium known to have variations in toxicity. Its binary toxins, which is known to have a high toxicity, has a very low genetic variation, so that resistance problems has been reported. Therefore, exploration continues to be carried out to find a new effective and potential toxin to deal with the resistance problems. This study aims to analyze the genome of isolate 229C *L. sphaericus*, to identify the species of isolate 229C based on the 16S rRNA gene, and to identify toxin characteristics of the 229C isolate based on the results of genome sequence analysis. The 229C isolate was previously obtained from soil sample in Indonesia and showed a high pathogenicity against *C. quinquefasciatus*. Molecular identification was carried out with the 16S rRNA gene analysis. While draft genome and toxin analysis performed by conducting whole genome sequencing using Illumina Hiseq 2000, 250 bp pair-end protocol. The sequenced data then analyzed using freely available bioinformatics tools. The results of the molecular identification showed that the closest related species of isolate 229C was *L. sphaericus*. The isolate 229C has a genome size of 4.65 Mbp and G+C content of 36.83%. Toxin analysis showed that this isolate did not contain Mosquitocidal toxin (Etx/Mtx), binary toxin (Bin protein), crystal toxin (Cry48/Cry49 protein), nor Sphaericolysin genes. However, there are s-layer protein and hemolysin genes that also known to be associated with the toxicity of *L. sphaericus* to mosquitoes and possibly, are the answer to the problem of resistance to binary toxins. This result opens the opportunity for an analysis of the effectiveness of S-layer protein and Hemolysin against resistance population mosquitoes.

Keywords: Draft Genome; Hemolysin; *Lysinibacillus sphaericus*; S-layer protein; Vector mosquitoes.

Pendahuluan

Lysinibacillus sphaericus pertama kali diisolasi dari larva instar 4 *Culiseta incidens* di Fresno, California (Kellen *et al.*, 1965). Studi yang dilakukan setelahnya menunjukkan spesifisitas yang tinggi dari aktivitas entomopatogen bakteri ini terhadap nyamuk *Culex* dan *Anopheles* spp. Oleh karena itu, hingga saat ini *L. sphaericus* dikenal dan digunakan secara luas sebagai bioinsektisida dan merupakan bagian dari program pengendalian vektor penyakit tropis infeksius (Berry, 2012).

Aktivitas entomopatogen dari *L. sphaericus* disebabkan oleh keberadaan toxin yaitu *Mosquitocidal toxin* (Mtx protein), *Binary toxin* (BinA–BinB), *Crystal toxin* (Cry48/Cry49), S-layer protein, dan Hemolysin (Allievi *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2007; Lozano *et al.*, 2011; Rojas-Pinzón & Dussán, 2017). Namun, bakteri ini memiliki variasi tingkat toksisitas dan tidak semua *strain L. sphaericus* memiliki protein toksin tersebut.

Toksin yang sering ditemukan pada *strain L. sphaericus* dengan level toksisitas tinggi ialah *binary toxin*. Menurut Berry (2012), gen

pengkode protein *binary toxin* sangat *conserved* di antara strain-strain yang telah diketahui. Variasi genetik pada *binary* toksin yang rendah mengakibatkan sedikitnya opsi toksin yang dapat digunakan (Hire *et al.*, 2009). Sehingga penggunaan satu isolat *L. sphaericus* yang tidak terkendali menyebabkan reaksi resistensi terhadap target (Silva-Filha, *et al.*, 2014). Hingga kini telah dilaporkan masalah resistensi dari *C. quinquefasciatus* terhadap *Binary toxin*. Oleh karena itu, perlu terus dikembangkan penelitian untuk mencari koleksi isolat baru yang menghasilkan toksin dengan efektivitas lebih tinggi dan dapat mengatasi permasalahan resistensi yang terjadi.

Penelitian yang dilakukan oleh Purwanto (2006) telah berhasil mengisolasi 1209 bakteri *L. sphaericus* yang diperoleh dari 418 sampel tanah dari berbagai wilayah di Indonesia. Salah satu di antaranya, yaitu isolat 229C, diketahui memiliki patogenisitas yang lebih tinggi dibanding strain pembanding 1593 ketika diujikan terhadap larva nyamuk *C. quinquefasciatus* (Indayati & Purwanto, 2021). Namun, belum diketahui karakteristik molekular dan jenis toksin apa yang diproduksi oleh isolat ini.

Dalam rangka pengembangan isolat 229C sebagai potensial biolarvasida, perlu diketahui dan dipastikan identitas isolat tersebut serta posisinya dalam pohon filogenetik. Selain itu, perlu pula dilakukan analisis untuk mengetahui karakteristik molekular dan keberadaan toksinnya dengan menggunakan teknologi sekuensing genom. Hasil penelitian ini nantinya akan memberikan basis informasi mengenai koleksi isolat bakteri dengan toksin yang bersifat patogen terhadap nyamuk vektor dan memberikan alternatif pengendalian hayati untuk mengatasi permasalahan resistensi yang terjadi.

Bahan dan Metode

Re-culturing, Perbanyakan, dan Preparasi Sampel

Isolat 229C merupakan isolat yang sebelumnya dikoleksi dari tanah dan merupakan *L. sphaericus* berdasarkan pengamatan morfologi di bawah mikroskop fase kontras perbesaran 1000×. Proses *re-culturing* dilakukan dengan metode *quadrant streak* pada medium NA *plate*.

Koloni yang terpisah kemudian ditumbuhkan pada agar miring untuk kemudian diamati homogenitasnya di bawah mikroskop fase kontras perbesaran 1000× setelah 2×24 jam. Bakteri kemudian disiapkan untuk pengiriman ke MicrobesNG, Birmingham, UK sebagai pihak penyedia jasa sekuensing genom. Preparasi sampel dilakukan dengan cara mencampurkan isolat bakteri dengan 100 µl larutan Ringer untuk ditumbuhkan pada 25 ml medium NA pada *plate* dengan 1/3 dari *plate* dipenuhi oleh bakteri hingga ditumbuhi dengan padat, sementara 2/3 sisanya dicoretkan (*streak*). Setelah diinkubasi pada pertumbuhan yang sesuai, bakteri kemudian dipanen dan diletakkan pada *barcoded tube* yang telah disediakan oleh MicrobesNG, kemudian dikirimkan pada suhu ruang.

Isolasi DNA dan Sekuensing Genom

Proses selanjutnya yakni isolasi DNA dan tahap sekuensing genom yang dilakukan sesuai dengan ketentuan dan protokol yang ditetapkan oleh pihak penyedia jasa (MicrobesNG, n.d., 2018). Pada isolasi DNA, tiga *beads* dicuci dengan buffer ekstraksi yang mengandung lisozym dan RNAase A, kemudian diinkubasi selama 25 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya proteinase K dan RNAase A ditambahkan dan diinkubasi selama 5 menit pada 65°C. DNA genom dimurnikan menggunakan volume yang sama dari *beads* SPRI dan diresuspensi dalam EB buffer. Pada tahap sekuensing genom, DNA dikuantifikasi dalam rangkap tiga dengan uji Quantit dsDNA HS dalam Ependorff AF2200 *plate reader*. DNA genom *library* selanjutnya disusun menggunakan Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA) Kemudian DNA genom *library* yang dikumpulkan dikuantifikasi menggunakan mesin *Kapa Biosystems Library Quantification Kit for Illumina on a Roche light cycler 96 qPCR*. DNA genom *library* diurutkan dengan *Illumina HiSeq 2000* menggunakan protokol *pair-end* 250bp.

Analisis Data

Penyusunan Contigs

Genom yang telah disekuensing dengan menggunakan Illumina HiSeq 2000 sebagai layanan yang disediakan oleh MicrobesNG (Birmingham, UK) terlebih dahulu dipotong menggunakan Trimmomatic 0.30 dengan *sliding*

window quality cutoff Q15 (Bolger *et al.*, 2014). Tahap ini dilakukan untuk menghilangkan adapter yang terligasi di setiap ujung fragmen pada tahap pengurutan genom. Hasil pembacaan (*reads*) yang telah di-*trim* kemudian dinilai kualitasnya menggunakan skrip internal yang digabungkan dengan perangkat lunak, yaitu Samtools (Li *et al.*, 2009), BedTools (Quinlan & Hall, 2010) dan bwa-mem (Li & Durbin, 2009). Potongan *contigs* selanjutnya disusun atau dirakit secara *de novo* (*de novo assembled*) menggunakan SPAdes versi 3.7 (Bankevich *et al.*, 2012). Sementara *assembly metrics* yang berkaitan dengan satuan-satuan hasil penyusunan sekuens genom dihitung menggunakan QUAST (Gurevich *et al.*, 2013).

Anotasi Genom dan Analisis Toksin

Anotasi genom dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi elemen fungsional di sepanjang sekuens genom. Langkah ini dilakukan menggunakan RAST (Overbeek *et al.*, 2014), dan Prokka 1.11 (Seemann, 2014). Hasil anotasi genom divisualisasikan dengan Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). Anotasi genom dengan Prokka dilakukan oleh pihak penyedia jasa sekuensing, sementara anotasi genom menggunakan RAST dilakukan melalui laman KBase (<https://www.kbase.us>) (Arkin *et al.*, 2018). Berkenaan dengan aktivitas larvasidal, gen pengkodean *binary* toksin (*BinA* dan *BinB*), toksin Mtx (yang terkait dengan tahap vegetatif), kristal toksin (*cry48/cry49*), protein S-layer, hemolysin, dan gen *chitin binding protein* dideteksi dengan BLASTP dan COBALT *Multiple Alignment* pada laman NCBI (Krauthammer *et al.*, 2000) serta MAUVE (Darling *et al.*, 2004).

Identifikasi Molekular dengan Gen 16S rRNA

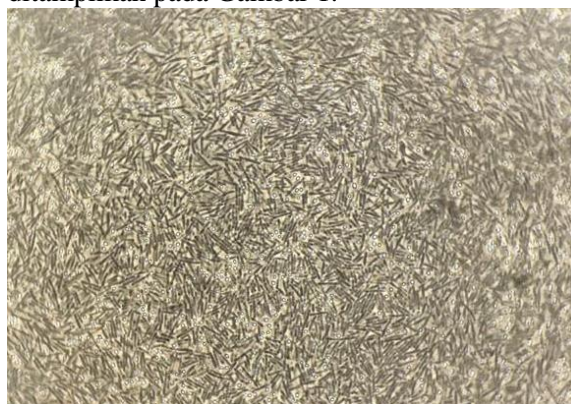
Identifikasi molekular dilakukan dengan menggunakan gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA didapatkan dengan cara memotong sekuens 16S rRNA hasil anotasi genom dengan bantuan Artemis (Rutherford *et al.*, 2000). Sekuens gen 16S rRNA kemudian dianalisis menggunakan Nucleotide BLAST pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hasil analisis Nucleotide BLAST berupa similaritas dan *identity* yang menunjukkan kemiripan sampel dengan spesies yang ada pada database GenBank. Hasil yang didapatkan selanjutnya digunakan

untuk memprediksi spesies dari sampel yang diteliti.

Hasil dan Pembahasan

Morfologi Bakteri Isolat 229C

Isolat bakteri 229C melalui proses pengamatan morfologis sebelum proses isolasi DNA dan sekuensing genom. Tahap ini dilakukan untuk membuktikan homogenitas dan kemurnian dari kultur bakteri. Hasil pengamatan tersebut ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Isolat 229C ketika diamati dengan mikroskop fase kontras perbesaran 1000 \times .

Karakteristik Genom dan Penilaian Kualitas Sekuensing

Hasil sekuensing genom menunjukkan bahwa kualitas *reads* dan sekuens genom memenuhi syarat. Hal ini ditandai dengan tingginya nilai *coverage* dari isolat ini, yaitu 87 \times . Kualitas *coverage* data sekuens *de novo* tergantung pada ukuran dan kontinuitas dari *contigs*. Untuk sebuah studi *whole genome sequencing*, rekomendasi *coverage* yang dinyatakan dalam kualitas baik ialah 30–50 \times per genom (Illumina Inc., 2017).

Berdasarkan hasil penyusunan *contigs*, diketahui hasil sekuensing genom memiliki kualitas yang tergolong median hingga baik. Hal ini didasarkan pada nilai G+C konten, jumlah *contigs*, ukuran genom, serta nilai N50, N75, L50, dan L75. Isolat 229C memiliki 36,83% konten G+C dengan total 119 *contigs*, dan ukuran genom 4,65 Mpb. Sedangkan nilai N50, N75, L50, dan L75 secara berurutan ialah 165,47; 79,98; 11; dan 20.

Selanjutnya sekuens melewati tahap anotasi genom yang bertujuan untuk mengidentifikasi elemen fungsional di sepanjang sekuens genom yang telah disusun di tahap sebelumnya. Informasi

mengenai elemen-elemen fungsional yang teridentifikasi kemudian dibubuhkan pada sekuens yang selanjutnya disimpan dengan format *genbank* (.gbk) untuk kemudian divisualisasikan dengan Artemis. Hasil anotasi genom isolat 229C yang mencakup berbagai kategori fungsi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil anotasi genom sampel isolat 229C

Statistik	229C
Jumlah Fitur/ Elemen Fungsional	4685
CRISPR	1
tRNA	91
tmRNA	1
Kode Genetik	11
Kategori Fungsional	
Karbohidrat	287
Respirasi	38
Nukleosida dan Nukleotida	63
<i>Stress Response</i>	50
Metabolisme Protein	103
Regulasi dan <i>Cell Signaling</i>	25
Dinding Sel dan Kapsul	65
Lain-Lain	12
Metabolisme RNA	66
Metabolisme Senyawa Aromatik	48
<i>Clustering-Based Subsystems</i>	48
Metabolisme Fosfor	26
<i>Phages, Prophages, Transposable Elements</i>	1
Metabolit Sekunder	9
Dormansi dan Sporulasi	39
Asam Amino dan Turunannya	304
Metabolisme Besi	47
<i>Phages, Prophages, Transposable Elements, Plasmid</i>	6
Pembelahan Sel dan Siklus Sel	34
Transpor Membran	62
Metabolisme Nitrogen	16
Metabolisme Sulfur	17
Metabolisme DNA	69
Kofaktor, Vitamin, Kelompok	
Prostetik, Pigmen	148
Asam Lemak, Lipid, dan Isoprenoids	74

Virulensi, <i>Disease</i> , dan <i>Defense</i>	38
Metabolisme Potassium	4
Motilitas dan Kemotaksis	71

Identifikasi Molekuler

Sekuens 16S rRNA yang digunakan untuk identifikasi molekuler didapatkan dari sekuens genom isolat 229C. Sekuens genom isolat 229C diidentifikasi keberadaan gen 16S rRNanya kemudian dipotong pada sekuens tersebut dengan perangkat lunak Artemis. Sekuens 16S rRNA yang diperoleh tersebut selanjutnya dicari padanannya dari database *genbank* menggunakan *online Nucleotide BLAST* pada web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Dari hasil analisis didapatkan nilai *query cover* dan similaritas yang ditunjukkan dengan *percent identity*. Hasil analisis BLASTn disajikan pada Tabel 2.

Analisis Gen Toksin

Aktivitas larvasidal bakteri *L. sphaericus* terhadap *Cx. quinquefasciatus* ditentukan oleh keberadaan gen toksin seperti *mtx*, *bin*, *cry*, *sphaericolysin*, S-layer protein, dan Hemolysin. Untuk mendeteksi dan mengidentifikasi gen-gen tersebut digunakan perangkat lunak MAUVE serta BLASTP dan COBALT *Multiple alignment* (pada laman NCBI). Hasil analisis menunjukkan bahwa pada isolat 229C tidak ditemukan keberadaan gen toxin *mtx*, *bin*, dan *sphaericolysin*. Akan tetapi, isolat ini diketahui memiliki toksisitas yang tinggi. Maka diduga terdapat gen toksin lain yang meningkatkan toksisitas isolat ini terhadap nyamuk vektor. Gen yang ditemukan pada isolat ini ialah S-layer protein dan Hemolysin yang diketahui berkontribusi pada toksisitas isolat (Allievi *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2011; Rojas-Pinzón & Dussán, 2017).

Berdasarkan anotasi genom, ditemukan gen pengkode s-layer protein pada isolat 229C. Hasil anotasi dengan RAST dan Prokka menunjukkan jumlah s-layer protein yang berbeda. Kemudian ketika dilakukan *alignment* dengan MAUVE, ditemukan bahwa terdapat sekuens serupa dengan gen s-layer protein pada genom referensi *L.sphaericus* C3-41 yang pada genom sampel penelitian teridentifikasi sebagai *hypothetical protein* berdasarkan hasil anotasi.

Tabel 2. Hasil Analisis BLAST Gen Mitokondria 16S rRNA

Isolat	Sekuens terdekat di GeneBank	Accession Number	Query Cover	Identity	Author
229C	<i>L. sphaericus</i>	NR_042073.1	96%	100%	Swiderski, 2001
	<i>L. macroides</i>	NR_114920.1	96%	99.52%	Heyrman, 2005
	<i>L. fusiformis</i>	NR_042072.1	96%	99.37%	Swiderski, 2001
	<i>L. boronitolerans</i>	NR_041276.1	94%	99.51%	Ahmed, 2005
	<i>L. sphaericus</i>	NR_115529.1	93%	99.67%	Suzuki, 1993

Sehingga apabila hasil alignment tersebut dihitung, total gen s-layer protein pada isolat 229C ialah 11 kopi. Rincian jumlah dan lokasi gen s-layer protein disajikan pada Tabel 3. Hasil analisis dengan *bioinformatic tools* berbeda

menunjukkan jumlah yang berbeda pula. Hal ini terjadi karena setiap perangkat lunak menggunakan fitur dan metode yang berbeda dalam menganalisis genom sampel, baik dengan referensi maupun penyejajaran atau *alignment*.

Tabel 3. Jumlah dan lokasi gen s-layer protein hasil analisis dengan Prokka, RAST, dan MAUVE

	Prokka		RAST		MAUVE	
	Jumlah	Lokasi	Jumlah	Lokasi	Jumlah	Lokasi
2	1	CDS	8	CDS.2185	11	CDS_4036482
2		3236074		CDS.3280		CDS_4024245
9				CDS.3299		CDS_3842034
C				CDS.3319		CDS_2211401
				CDS.3897		CDS_3456062
				CDS.629		CDS_3236932
				CDS.764		CDS_3259370
				CDS.765		CDS_98204
						CDS_4114984
						CDS_714042
						CDS_588929

Berdasarkan anotasi genom isolat 229C, diketahui bahwa teridentifikasi gen pengkode hemolysin Hemolysin diketahui merupakan faktor virulensi penting dari bakteri entomopatogen yang meningkatkan efektivitas dari bakteri yang digunakan dalam pengendalian serangga (Andreeva *et al.*, 2007; Manjeet *et al.*, 2013). Hemolysin teridentifikasi pada 2 lokasi di

genom isolat 229C. Kedua *coding sequence* tersebut kemudian dianalisis dengan BLASTP untuk memastikan sekuens terdekat dari urutan asam amino yang diduga Hemolysin ini pada *database*. Rincian lokasi gen yang diduga merupakan hemolysin serta hasil BLAST Protein masing-masing CDS disajikan dalam Tabel 4.

Tabel4. Hasil BLASTP (5 teratas) sekuens asam amino hemolysin isolat 229C

No.	Description	Scientific Name	Query Cover	Percent Ident.	Acession number
CDS_250508					
1.	TlyA Family RNA Methyltransferase	<i>B. velezensis</i>	100%	99.63%	WP_173479027.1
2.	MULTISPECIES: TlyA Family RNA Methyltransferase	<i>Lysinibacillus</i>	100%	98.16%	WP_024361173.1
3.	TlyA Family RNA Methyltransferase	<i>L. sphaericus</i>	100%	97.79%	WP_069513091.1

4.	TlyA Family RNA Methyltransferase	<i>L. tabacifolii</i>	100%	97.79%	WP_108029719.1
5.	TlyA Family RNA Methyltransferase	<i>L. varians</i>	100%	97.79%	WP_025219921.1
CDS_4199394					
1.	Hemolysin III Family Protein	<i>B. velezensis</i>	100%	98.58%	WP_172771607.1
2.	MULTISPECIES: Hemolysin III Family Protein	Unclassified <i>Lysinibacillus</i>	100%	87.20%	WP_053592763.1
3.	Hemolysin III Family Protein	<i>L. xylanilyticus</i>	100%	87.20%	WP_068984143.1
4.	Hemolysin III Family Protein	<i>L. xylanilyticus</i>	100%	86.73%	WP_049665508.1
5.	Hemolysin III Family Protein	<i>Lysinibacillus</i> sp.	100%	87.20%	WP_053485925.1

Morfologi Bakteri Isolat 229C

L. sphaericus memiliki karakteristik morfologi yaitu berbentuk batang dengan spora berbentuk bulat (*spherical*) yang terdapat pada bagian terminal. Spora terletak di dalam sebuah sporangium yang membesar atau membengkak (Ahmed *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan, morfologi bakteri isolat 229C memiliki kesesuaian dengan morfologi bakteri *L. sphaericus*. Isolat ini memiliki morfologi sel yang berbentuk batang dengan spora berbentuk bulat di bagian terminal. Pengamatan dilakukan pada usia 2×24 jam dari kultur bakteri, sehingga dipastikan isolat bakteri sudah bertumbuh sporanya dan dapat teramati dengan jelas.

Karakteristik Draft Genom dan Penilaian Kualitas Hasil Sekuensing

Konten G+C sampel bakteri *L. sphaericus* isolat 229C ialah 36,83%. Nilai tersebut hampir memiliki kesamaan dengan *strain* referensi bakteri *L. sphaericus* yang biasanya memiliki konten G+C dengan kisaran 37-38%, seperti isolat C3-41 dengan kandungan G + C 37,29% (Hu *et al.*, 2008), *strain L. sphaericus* rekomendasi WHO 2362 dengan kandungan G + C 37,3% (Hernández-Santana *et al.*, 2016), *strain* OT4b.25 dengan kandungan G + C 37,15% (Rey *et al.*, 2016), *strain* dengan *low level toxicity* KCTC 3346^T atau DSM 28 dengan kandungan G + C 37,1% (Jeong *et al.*, 2013), dan *strain* LMG22257 yang memiliki kandungan G + C 38,99% (Yan *et al.*, 2017).

Sekuens genom bakteri *L. sphaericus* isolat 229C memiliki ukuran 4,65 Mbp. Berdasarkan referensi studi *whole genome sequencing* pada *strain* referensi bakteri *L. sphaericus*, bakteri ini memiliki ukuran genom yang berkisar antara 4 – 5

Mbp, seperti C3-41 yang berukuran 4, 64 Mbp (Hu *et al.*, 2008), isolat referensi WHO 2362 yang berukuran 4,67 Mbp (Hernández-Santana *et al.*, 2016), isolat *metal tolerance* CBAM5 yang berukuran 5,14 Mbp (Peña-Montenegro *et al.*, 2015), *strain* entomopatogen OT4b.25 yang berukuran 4,66 Mbp (Rey *et al.*, 2016), serta *strain* dengan *low level toxicity* terhadap larva nyamuk, KCT 3346^T atau DSM28, yang berukuran 4,56 Mb (Jeong *et al.*, 2013). Berdasarkan uraian ini, diketahui bahwa isolat 229C memiliki karakteristik genom yang sesuai karakter bakteri *L. sphaericus*.

Identifikasi Molekuler

Tabel 2 menunjukkan 5 sekuens teratas yang ditunjukkan berdasarkan hasil analisis dengan BLASTn untuk setiap sampel isolat. Pengurutan tersebut didasarkan pada *percent identity* terbesar hingga terkecil dilanjutkan dengan *query cover* terbesar hingga terkecil. Berdasarkan hasil analisis tersebut, dari sampel sekuens gen 16S rRNA isolat 229C, diketahui memiliki similaritas yang paling tinggi dengan *L. sphaericus*. *Percent identity* mengacu pada pengukuran kuantitatif mengenai kesamaan antara dua urutan (baik DNA, asam amino, atau yang lainnya). Spesies yang berkerabat dekat memiliki *percent identity* yang lebih tinggi daripada spesies yang berkerabat lebih jauh. Dengan demikian, *percent identity* pada tingkat tertentu menunjukkan kedekatan atau keterkaitan (Quick & Sikela, *n.d.*). Demikian halnya dengan *query coverage*. *Query coverage* menunjukkan persentase dari panjang kueri sekuens yang disertakan dalam *alignment* (Newell *et al.*, 2013).

Pada studi mikrobioma modern, analisis urutan 16S rRNA sering digunakan dalam identifikasi taksonomi dari *strain* bakteri maupun

archaea. Analisis ini menjadi standar *de facto* untuk taksonomi prokariotik. (Bukin *et al.*, 2019). Sekuens 16S rRNA akan dikelompokkan berdasarkan similaritas-nya untuk menghasilkan *Operational Taxonomy Unit* (OTU) dan sekuens OTU representatif akan dibandingkan dengan *database* referensi untuk menyimpulkan kemungkinan taksonominya. Akan tetapi, analisis ini memerlukan asumsi tertentu untuk menginterpretasikan hasil analisisnya. Asumsi interpretasi similaritas yang diketahui saat ini ialah bahwa urutan *identity* >95% mewakili kesamaan genus, sedangkan nilai *identity* >97% mewakili spesies yang sama (Schloss & Handelsman, 2005).

Pada hasil analisis dengan BLASTn diketahui bahwa isolat 229C memiliki 100% *identity* dengan *L. sphaeriuus*, sehingga dipastikan bahwa isolat ini merupakan jenis bakteri *L. sphaericus*. Namun, hasil BLASTn pada urutan kedua hingga kelima menunjukkan *identity* yang cukup besar yakni di atas 99%, yang dapat dikatakan tidak berbeda secara signifikan. Berdasarkan pemaparan tersebut, diketahui bahwa pada hasil ini, ketentuan >97% *identity* merepresentasikan organisme satu spesies menjadi tidak tepat. Karena *identity* 99% pada hasil BLASTn menunjukkan spesies yang beragam, mulai dari *L. sphaericus*, *L. fusiformis*, *L. macroides*, dan *L. boronitolerans*.

Gen 16S rRNA diketahui memiliki kurang lebih 1600 pasangan basa dan mencakup Sembilan daerah hipervariabel dengan berbagai *sub-region* (daerah) yang *conserve*, dinyatakan dengan V1 – V9. *Sub-region* yang lebih *conserve* berguna untuk menentukan tingkatan taksa yang lebih tinggi, sedangkan *sub-region* yang berevolusi lebih cepat dapat membantu mengidentifikasi pada tingkatan genus atau spesies (Bukin *et al.*, 2019). Menurut Johnson *et al.* (2019), pilihan *sub-region* dapat mempengaruhi jumlah OTU yang terbentuk saat pengelompokan ampikon secara *in-silico* untuk membuat OTU. Jumlah relatif OTU yang dihasilkan untuk setiap *sub-region* tidak konsisten pada ambang nilai *identity* yang berbeda (97%, 98%, 99%). Hal ini menunjukkan bahwa perilaku algoritma pengelompokan sulit diprediksi ketika jumlah informasi yang terkandung dalam *sub-region* yang diurutkan sangat bervariasi. Berdasarkan hal tersebut, dikatakan bahwa penargetan *sub-region* dengan

16S rRNA ini cukup untuk mewakili identifikasi taksa di tingkat genus atau di atasnya, tetapi untuk memprediksi spesies masih kurang valid. Meskipun beberapa *sub-region* diketahui memberikan hasil yang cukup masuk akal (V1-V3), sebagian besar tidak bisa menangkap variasi urutan yang cukup untuk membedakan taksa yang terkait erat.

Setiap taksa memiliki perbedaan *sub-region* yang cocok untuk dapat membedakannya, terutama pada taksa-taksa yang terkait erat (Johnson *et al.*, 2019). Maka diketahui bahwa pada penelitian ini hasil identifikasi molekuler gen 16S rRNA belum dapat mewakili identifikasi taksa di tingkat spesies. Anggota genus *Lysinibacillus* diketahui memiliki keterkaitan yang erat dan membutuhkan pemilihan *sub-region* yang tepat untuk membedakan spesiesnya. Pada penelitian ini, dinyatakan bahwa sampel merupakan spesies *L. sphaericus*. Hal ini dikarenakan nilai *identity* yang mencapai 100%. Untuk hasil lain, meskipun tidak signifikan berbeda, akan tetapi terdapat perbedaan basa nukleotida meskipun sangat sedikit. Mutasi pada bakteri terjadi sangat cepat karena pertumbuhannya yang juga sangat cepat. Untuk dapat mengetahui perbedaan antarspesies anggota genus *Lysinibacillus* selain melalui analisis morfologi dan molekuler ialah dengan analisis karakteristik biokimiawi. Namun, pada penelitian ini analisis karakteristik biokimiawi masih belum dapat dilakukan.

Analisis Gen Toksin

Berdasarkan analisis gen toksin, ditemukan gen pengkode S-layer protein pada isolat 229C. Peran patogen dari protein S-layer telah ditunjukkan pada bakteri *L. sphaericus* terhadap larva nyamuk *C. quinquefasciatus* dan *Aedes aegypti* (Allievi *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2011). Pada fase sporulasi, spora *L. sphaericus* mempertahankan keberadaan protein S-Layer dan berasosiasi dengan Bin protein. Keberadaan toksin BinA-BinB dan protein S-Layer dalam spora suatu *strain L. sphaericus* berkontribusi terhadap patogenisitas *L. sphaericus*. Selain terdapat pada fase sporulasi *L. sphaericus* dan asosiasinya dengan protein toxin lain, protein S-layer juga terdapat pada fase vegetatif bakteri dan bersifat *mosquitocidal* meski tidak berasosiasi dengan protein *toxin* lainnya (Allievi *et al.*, 2014).

Protein S-Layer memiliki aktivitas hemolisis. Aktivitas ini menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel target yang disebabkan oleh interaksi protein dengan lipid. Aktivitas hemolitik akan membantu efek patogenik protein S-Layer terhadap larva nyamuk dan diduga berkontribusi dalam menurunkan jumlah nyamuk resisten (Allievi *et al.*, 2014).

Berdasarkan anotasi genom isolat 229C, diketahui bahwa teridentifikasi gen pengkode hemolysin. Hemolysin merupakan faktor virulensi penting dari bakteri entomopatogen yang meningkatkan efektivitas dari bakteri yang digunakan dalam pengendalian serangga (Andreeva *et al.*, 2007; Manjeet *et al.*, 2013).

Keberadaan hemolysin ditandai dengan keberadaan gen *hlyD*, *hlyA*, dan *hly-III*. Hasil BLASTP pada CDS yang terdeteksi sebagai hemolysin pada anotasi genom menunjukkan bahwa Hemolysin yang teridentifikasi pada setiap isolat bakteri merupakan Hemolysin A dan Hemolysin III, sedangkan Hemolysin D tidak teridentifikasi pada keempat isolat bakteri. Gen *hlyD* merupakan gen hemolysin yang berhubungan dengan sekresi protein hemolysin (Burgos & Beutin, 2010). Berbeda dengan HemolysinD, HemolysinA atau rRNA methyltransferase TlyA (disingkat *HlyA* atau TlyA) adalah eksotoksin yang menyerang membran sel darah dan menyebabkan pecahnya sel yang disebabkan oleh natrium ribonukleat, dan umumnya diproduksi oleh strain bakteri patogen. Gen lainnya, *hly-III*, mengkode hemolysinIII memiliki berperan sebagai *pore-forming* hemolysin (Baida & Kuzmin, 1996).

Protein S-layer dan hemolysin diketahui memiliki keterkaitan dalam aktivitas entomopatogennya. Sebuah penelitian melaporkan adanya domain hemolitik dalam protein S-layer dan aktivitas larvasida dari protein tersebut dikaitkan dengan keberadaan domain tersebut (Allievi *et al.*, 2014). Domain hemolitik yang berkaitan dengan protein s-layer dapat menjadi faktor toksik yang berkontribusi terhadap aktivitas entomopatogenik *L. sphaericus* (Rojas-Pinzón & Dussán, 2017a). Adapun efek toksisitas dari hemolysin, setelah *L. sphaericus* dicerna oleh larva, bakteri mengenali reseptor spesifik dan melepaskan hemolysin yang melisis sel epitel midgut larva nyamuk, seperti yang terjadi pada *Cx. quinquefasciatus* dengan toksin Biner (Lekakarn *et al.*, 2015).

Berdasarkan analisis toksin isolat 229C, diketahui bahwa pada isolat ini tidak ditemukan gen binary toksin yang diketahui sangat *conserved* pada *strain* dengan level toksisitas tinggi terhadap nyamuk. Namun, hasil anotasi genom yang dilanjutkan dengan analisis toksin dengan berbagai *bioinformatics tools* membuktikan bahwa pada sampel penelitian terdapat gen pengkode s-layer protein dan hemolysin. Keduanya merupakan gen yang terbukti memiliki aktivitas entomopatogen terhadap populasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang resisten terhadap binary toksin dan *A. aegypti* (Allievi *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2011; Rojas-Pinzón & Dussán, 2017). Hasil ini menjadi penemuan yang prospektif sebagai pengembangan biolarvasidal potensial terhadap nyamuk vektor, *Cx. quinquefasciatus* dan *A. aegypti*, di mana keduanya dikenal sebagai vektor berbagai penyakit yang merugikan. Selain itu, hasil ini juga menjadi jawaban atas permasalahan resistensi yang terjadi pada nyamuk *Cx. quinquefasciatus* terhadap binary toksin yang diketahui sangat *conserved* pada *L. sphaericus* dengan *high level toxicity*. Penemuan ini juga membuka peluang dilakukannya penelitian lebih lanjut yang terfokus pada isolasi dan identifikasi terhadap s-layer protein dan hemolysin tersebut untuk mengetahui efektivitas toksin serta mekanisme kerjanya dalam mengakibatkan kematian pada larva nyamuk vektor penyakit.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa hasil analisis genom menunjukkan 229C memiliki konten G+C 36,83% dan ukuran genom 4.65 Mbp. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat 229C secara morfologis dan molekuler merupakan *L. sphaericus*. Berdasarkan analisis gen toksin yang dilakukan pada penelitian ini, diketahui bahwa pada isolat 229C tidak teridentifikasi adanya toksin Mtx, Bin, Cry, maupun sphaericolysin. Akan tetapi teridentifikasi adanya gen s-layer protein dan hemolysin. Keduanya diketahui merupakan gen yang memiliki aktivitas entomopatogen terhadap populasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang resisten terhadap binary toksin serta *A. aegypti* yang diketahui merupakan vektor penyakit yang sangat merugikan pada

manusia. Penemuan ini menjawab permasalahan resistensi yang terjadi pada *Cx. quinquefasciatus* terhadap *binary toxin*. Selain itu, penemuan s-layer protein dan *hemolysin* sebagai faktor toksisitas baru pada penelitian ini membuka peluang untuk penelitian lebih lanjut terhadap kedua gen tersebut sebagai toksin baru terhadap larva nyamuk.

Ucapan terima kasih

Penelitian ini dibiayai oleh Universitas Gadjah Mada melalui Program Rekognisi Tugas Akhir (RTA) 2020 yang diberikan kepada Hari Purwanto. Kami berterima kasih kepada kolega kami, Ika Indayati, dan seluruh staff Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi, dan Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Antar Universitas UGM, atas bantuannya selama penyusunan studi ini.

Referensi

- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63867-0>
- Allievi, M. C., Palomino, M. M., Acosta, M. P., Lanati, L., Ruzal, S. M., & Sánchez-Rivas, C. (2014). Contribution of S-layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111114>
- Andreeva, Z. I., Nesterenko, V. F., Fomkina, M. G., Ternovsky, V. I., Suzina, N. E., Bakulina, A. Y., Solonin, A. S., & Sineva, E. V. (2007). The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(2), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.004>
- Arkin, A. P., Cottingham, R. W., Henry, C. S., Harris, N. L., Stevens, R. L., Maslov, S., Dehal, P., Ware, D., Perez, F., Canon, S., Sneddon, M. W., Henderson, M. L., Riehl, W. J., Murphy-Olson, D., Chan, S. Y., Kamimura, R. T., Kumari, S., Drake, M. M., Brettin, T. S., ... Yu, D. (2018). KBase: The United States department of energy systems biology knowledgebase. *Nature Biotechnology*, 36(7), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>
- Baida, G. E., & Kuzmin, N. P. (1996). Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1284(2), 122–124. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00168-X)
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.008>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Burgos, Y., & Beutin, L. (2010). Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-193>
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., &

- Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hernández-Santana, A., Gómez-Garzón, C., & Dussán, J. (2016). Complete genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* WHO reference strain 2362. *Genome Announcements*, 4(3), 9–10. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00545-16>
- Hire, R. S., Hadapad, A. B., Dongre, T. K., & Kumar, V. (2009). Purification and characterization of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* BinA protein. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.005>
- Hu, X., Fan, W., Han, B., Liu, H., Zheng, D., Li, Q., Dong, W., Yan, J., Gao, M., Berry, C., & Yuan, Z. (2008). Complete genome sequence of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and comparison with those of closely related bacillus species. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2892–2902. <https://doi.org/10.1128/JB.01652-07>
- Illumina Inc. (2017). Illumina sequencing introduction. *Illumina Sequencing Introduction*, October, 1–8. https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Jeong, H., Jeong, D. E., Sim, Y. M., Park, S. H., & Choi, S. K. (2013). Genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* strain KCTC 3346T. *Genome Announcements*, 1(4), 4–5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00625-13>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, G. W., Nielsen-Leroux, C., Yang, Y., Yuan, Z., Fiúza Dumas, V., Monnerat, R. G., & Berry, C. (2007). A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *The FASEB Journal*, 21(14), 4112–4120. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8913com>
- Kellen, W. R., Clark, T. B., Lindegren, J. E., Ho, B. C., Rogoff, M. H., & Singer, S. (1965). *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7(4), 442–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(65\)90120-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(65)90120-5)
- Krauthammer, M., Rzhetsky, A., Morozov, P., & Friedman, C. (2000). Using BLAST for identifying gene and protein names in journal articles. *Gene*, 259(1–2), 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00431-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00431-5)
- Lekakarn, H., Promdonkoy, B., & Boonserm, P. (2015). Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.09.010>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Lozano, L. C., Ayala, J. A., & Dussán, J. (2011). *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. *Biotechnology Letters*, 33(10), 2037–2041. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0666-9>
- Manjeet, K., Purushotham, P., Neeraja, C., & Podile, A. R. (2013). Bacterial chitin

- binding proteins show differential substrate binding and synergy with chitinases. *Microbiological Research*, 168(7), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.01.006>
- MicrobesNG. (n.d.). MicrobesNg Methods Document. *Microbesng.Com*.
- MicrobesNG. (2018). *Preparing stock tubes for MicrobesNG*. 6–7.
- Newell, P. D., Roco, C. A., Fricker, A. D., Merkel, S. M., & Chandrangsu, P. (2013). A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST †. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14(2), 238–243. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F., & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 206–214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Peña-Montenegro, T. D., Lozano, L., & Dussán, J. (2015). Genome sequence and description of the mosquitocidal and heavy metal tolerant strain *Lysinibacillus sphaericus* CBAM5. *Standards in Genomic Sciences*, 10(FEBRUARY2015). <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-2>
- Quick, V. S., & Sikela, J. (n.d.). *Percent Identity of Genomic DNA and Amino Acid Sequences*. Center for Academic Research and Training in Anthropogeny. Retrieved March 1, 2021, from <https://carta.anthropogeny.org/moca/topics/percent-identity-genomic-dna-and-amino-acid-sequences#:~:text=Percent identity refers to a,to a degree reflects relatedness>.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rey, A., Silva-Quintero, L., & Dussán, J. (2016). Complete genome sequence of the larvicidal bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.25. *Genome Announcements*, 4(3), 10–12. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00257-16>
- Rojas-Pinzón, P. A., & Dussán, J. (2017). Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2348-9>
- Rojas-Pinzón, P. A., & Dussán, J. (2017b). Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2348-9>
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A., & Barrell, B. (2000). Artemis: Sequence Visualization and Annotation. *Bioinformatics*, 16, 944–945.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1501–1506. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1501-1506.2005>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Yan, W., Xiao, X., & Zhang, Y. (2017). Complete genome sequence of *Lysinibacillus sphaericus* LMG 22257, a strain with ureolytic activity inducing calcium carbonate precipitation. *Journal of Biotechnology*, 246, 33–35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.016>