

RINGKASAN

Tempe merupakan salah satu produk fermentasi yang berasal dari Indonesia, berbahan dasar kacang kedelai, dibuat melalui proses fermentasi yang melibatkan kapang *Rhizopus* spp.. Penemuan terakhir menjelaskan bahwa telah ditemukan bakteri endosimbion dari kelompok *Burkholderia* spp. pada miselium kapang *R.microsporus* yang diketahui mampu menghasilkan mikotoksin berupa *rhizonin* dan *rhizoxin*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri endosimbion yang ditemukan pada kapang *Rhizopus* spp. dari beberapa sampel asal Indonesia, untuk mengetahui hubungan kekerabatan isolat *Rhizopus* spp. dengan *Rhizopus* spp. yang telah dilaporkan, serta mengetahui filogenetik bakteri-bakteri endosimbion pada kapang *Rhizopus* spp. asal Indonesia dengan bakteri endosimbion *Burkholderia* yang telah dilaporkan.

Isolat-isolat bakteri endosimbion diisolasi dari 9 strain sampel isolat kapang *R.microsporus* var. *oligosporus* (kode ATH Pr, ATH 1, ATH 10, ATH 24, ATH 27, ATH 35, ATH 40, ATH 53, dan ATH 63). Proses karakterisasi dan identifikasi bakteri endosimbion dilakukan melalui metode pewarnaan Gram serta teknik molekuler melalui beberapa tahapan, di antaranya; purifikasi isolat bakteri, penumbuhan isolat bakteri pada medium NA, ekstraksi DNA dan perbanyakan DNA melalui proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan KAPA3G®, elektroforesis gel, sekuensing DNA, analisis sekuen DNA melalui program Chromas Pro®, dan analisis filogenetik menggunakan aplikasi MEGA 6.0. Amplifikasi DNA dilakukan pada gen lestarti 16S rRNA. Ekstraksi dan perbanyakan DNA kapang melalui PCR menggunakan Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100) (Genaid, Taiwan) dan GoTaq® Green Master Mix pada daerah ITS, dan identifikasi morfologi melalui pembuatan preparat *slide culture*.

Sebanyak 11 isolat bakteri berhasil diperoleh dalam penelitian ini. Kesebelas isolat tersebut adalah 1a, 1b, 1c, 5c berasal dari isolat ATH Pr; 1d berasal dari ATH 24; 5a, 5b dari isolat ATH 27; 3c dari isolat ATH 35; 8a dari isolat ATH 53; 4d, 4e dari isolat ATH 63. Hasil identifikasi menggunakan analisis filogenetik molekuler menunjukkan bahwa isolat 1a adalah *Staphylococcus* sp. karena berada satu klade parafiletik dengan *S. cohnii* strain GH 137^T, *S. cohnii* subsp. *urealyticus* strain CK 27^T, dan *S. nepalensis* strain CW1^T. Isolat 1d adalah *S. arlettae* karena berada satu klade monofiletik dengan *S. arlettae* strain ATCC 43957^T. Isolat 4e adalah *S.saprophyticus* karena berada satu klade monofiletik dengan *S. saprophyticus* NBRC102446^T dan *S. aprophyticus* subsp. *bovis* GTC843. Isolat 4d, 5c, 3c adalah *Bacillus* sp. karena satu klade parafiletik dengan *B. subtilis* JCM1465^T, *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM10^T, *B. tequilensis* 10b^T. Isolat 5a dan 5b adalah *B. cereus* karena berada satu klade monofiletik dengan *B. cereus* strain CCM 2010^T. Isolat 1b dan 1c adalah *Pseudomonas* sp. Isolat 8a tidak dapat dianalisis secara filogenetik karena hasil sekuensing tidak terlalu bagus yang ditunjukkan dengan banyaknya basa nukleotida yang tidak dapat terbaca identitasnya. Hasil analisis morfologi dan filogenetik kapang *Rhizopus* menunjukkan bahwa kesembilan isolat merujuk pada dua galur utama, yaitu *R. microsporus* dan *R. delemar*.

Kata kunci : 16S rRNA, bakteri endosimbion, filogenetik, Indonesia, *Rhizopus* spp., tempe

SUMMARY

Tempe is one of Indonesian indigenous soybean-based fermentation products that involves *Rhizopus* spp. during the fermentation process. Several studies reported that bacterial belong to *Burkholderia* spp. forming endosymbiotic association with mycelium of *R. microsporus*. These bacteria have been detected capable to produce mycotoxins namely rhizonin and rhizoxin. This study aims to determine the types of endosymbion bacteria found in *Rhizopus* spp. from several samples in Indonesia, to know the relationship *Rhizopus* spp. isolates with *Rhizopus* spp. that have been reported and to know the relationship between endosymbiotic bacteria in *Rhizopus* spp. from Indonesia with *Burkholderia's* endosymbiotic bacteria that have been reported.

Endosymbiotic bacterial isolates were isolated from 9 strains of *Rhizopus* spp. ATH Pr, ATH 1, ATH 10, ATH 24, ATH 27, ATH 35, ATH 40, ATH 53, and ATH 63). Morphological characterization was carried out using Gram staining method and identification was conducted by molecular technique through several stages such as purification of bacteria, the growth of bacteria on medium NA, DNA extraction and propagation of DNA through PCR (Polymerase Chain Reaction) using KAPA3G[®], electrophoresis, analysis of DNA sequences through the Chromas Pro[®] program, and phylogenetic analysis using MEGA 6.0 software. DNA amplification was conducted based on sequence from 16S rRNA gene. The DNA extraction and propagation of *Rhizopus* through PCR using Plant Genomic DNA Mini Kit (GP100) (Genaid, Taiwan) and GoTaq[®] Green Master Mix, based on sequence from ITS region, and morphological identification through the manufacture of slide culture preparations.

A total eleven bacterial isolates were successfully obtained in this study. There are 1a, 1b, 1c, 5c derived from ATH Pr; 1d derived from ATH 24; 5a and 5b isolates derived from ATH 27; 3c isolate derived from ATH 35; 8a isolate derived from ATH 53; 4d, 4e isolates derived from ATH 63. Identification using molecular phylogenetic analysis showed that 1a sequence is *Staphylococcus* sp. due to nested in the same clade with *S. cohnii* strain GH137^T, *S. cohnii* subsp. *urealyticus* strain CK27^T, and *S. nepalensis* strain CW1^T. The 1d isolate is *S. arlettae* because it is monophyletic clade with *S. arlettae* ATCC43957^T. The 4e isolate is *S. saprophyticus* because it is monophyletic clade with *S. saprophyticus* NBRC102446^T and *S. saprophyticus* subsp. *bovis* GTC843^T. The 4d, 5c, 3c isolates are *Bacillus* sp. because they are paraphyletic clade with *S. subtilis* JCM1465^T, *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM10^T, and *B. tequilensis* 10b^T. The 5a and 5b isolates are *B. cereus* because they are monophyletic clade with *B. cereus* strain CCM2010^T. The 1b and 1c isolates are *Pseudomonas* sp. The 8a isolate is still unidentified due to unreadable sequence data. Phylogenetic and morphological analyses of *Rhizopus* showed that all nine isolates refer to the two strains, namely *R. microsporus* and *R. delemar*.

Keywords : 16S rRNA, bakteri endosimbion, Indonesia, phylogenetic, *Rhizopus* spp., tempe