

Identifikasi Molekuler Isolat Bakteri Entomopatogen, Uji Keamanan Hayati serta Potensinya untuk Pengendalian Serangga Hama

Rista Susanti^{1,3}, Fitri Widiyanti^{2*}, dan Danar Dono²

¹Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran

²Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran
Kampus Jatinangor, Jl. Raya Bandung-Sumedang Km 21, Jatinangor, 45363.

³Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan, Direktorat Jenderal Tanaman Pangan
Jl. Raya Kaliasin Tromol Pos 1, Jatisari, Karawang

*Alamat korespondensi: fitri.widiyanti@unpad.ac.id

INFO ARTIKEL	ABSTRACT/ABSTRAK
Diterima: 12-10-2024	Molecular identification of entomopathogenic bacterial isolates, biosafety tests and their potential as biocontrol agents of insect pests
Direvisi: 16-12-024	
Dipublikasi:31-12-2024	
Keywords: Antibiotic resistance assays, Blood haemolysis, Chitinolytic and proteolytic, Hypersensitive reaction, <i>Serratia marcescens</i>	Entomopathogenic bacteria have significant potential to produce toxins and other metabolites that may be utilized in insect pest management, one of them is <i>Serratia marcescens</i> . Toxins and extracellular degradative enzymes, such as proteases and chitinases, secreted by <i>S. marcescens</i> are virulence factors that make this bacterium lethal to insects. Entomopathogenic bacteria designated as pest control agents must be ecologically sustainable and not harmful to both human and non-target organisms. This study was objected to molecularly identifying 12 isolates of entomopathogenic bacteria, presumed <i>S. marcescens</i> , isolated from various infected insects, and to evaluate their antagonistic activities in which including the chitinase and protease activities, as well as some biosafety tests including blood hemolysis, hypersensitive reaction and antibiotic resistance assays. The research was carried out at the Laboratory of Biological Agents and the Molecular Laboratory of Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan (BBPOPT, Forecasting Centre for Plant Pest Organisms) Jatisari, Karawang from October 2023 to February 2024. The results of molecular identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) indicated that among the 12 bacterial isolates, coded Sm01-Sm12, 11 isolates were identified as <i>S. marcescens</i> , whilst Sm03 was identified as <i>Serratia nematodiphila</i> . The Sm02, Sm07, and Sm11 isolates had chitinolytic and proteolytic activities and showed neither blood haemolysis reaction nor hypersensitivity responses on tobacco. Sm02 and Sm07 were susceptible to 8 distinct antibiotics tested, i.e. Chloramphenicol 30 µg, Doxycycline 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Sulphamethoxazole 25 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Gentamicin 10 µg, Amikacin 30 µg, and Tetracycline 30 µg, whereas Sm11 was sensitive to all except Doxycycline and Tetracycline. Accordingly, <i>S. marcescens</i> isolate Sm02, Sm07, and Sm11 were potential as entomopathogenic bacteria that can be further studied for subsequent experimental evaluation.
Kata Kunci: Hemolisis darah, Kitinolitik dan proteolitik, Reaksi hipersensitif, <i>Serratia marcescens</i> , Uji resistensi antibiotik	Bakteri entomopatogen merupakan mikroorganisme dengan potensi besar sebagai sumber toksin dan metabolit yang dapat digunakan dalam program pengendalian serangga hama, salah satunya adalah bakteri <i>Serratia marcescens</i> . Toksin dan enzim degradatif ekstraseluler seperti protease dan kitinase yang disekresi oleh <i>S. marcescens</i> merupakan faktor virulensi, sehingga membuat bakteri ini sangat mematikan bagi serangga. Bakteri entomopatogen sebagai

agen pengendali hama harus ramah lingkungan dan tidak berbahaya baik bagi manusia maupun spesies non-target. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri entomopatogen secara molekuler dengan target *S. marcescens* dari berbagai sumber serangga terinfeksi, kemudian dilakukan pengujian terkait potensinya dalam mengendalikan serangga hama dan uji keamanan hayati meliputi uji aktivitas kitinase dan uji aktivitas protease, uji hemolisis darah, uji hipersensitivitas, serta uji resistensi antibiotik. Penelitian dilakukan di Laboratorium Agens Hayati dan Laboratorium Molekuler Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan (BBPOPT) Jatisari Karawang pada bulan Oktober 2023-Februari 2024. Hasil identifikasi secara molekuler dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menunjukkan bahwa dari 12 isolat bakteri kode Sm01-Sm12, 11 isolat teridentifikasi sebagai *S. marcescens* sedangkan isolat Sm03 teridentifikasi sebagai *Serratia nematodiphila*. Isolat Sm02, Sm07 dan Sm11 memiliki aktivitas kitinolitik dan proteolitik serta tidak menunjukkan reaksi hemolisis darah dan hipersensitif tanaman tembakau. Isolat Sm02 dan Sm07 sensitif terhadap 8 jenis antibiotik yang diujikan, yaitu Chloramphenicol 30 µg, Doxycycline 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Sulphamethoxazole 25 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Gentamicin 10 µg, Amikacin 30 µg, dan Tetracycline 30 µg, sedangkan Sm11 sensitif terhadap 6 jenis antibiotik yang diujikan selain Doxycycline dan Tetracycline. Dengan demikian, bakteri entomopatogen *S. marcescens* isolat Sm02, Sm07 dan Sm11 merupakan isolat yang berpotensi untuk dimanfaatkan dalam pengendalian serangga hama, serta layak untuk pengujian-pengujian tahap selanjutnya.

PENDAHULUAN

Pengendalian Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPT) sebaiknya dilakukan dengan menggunakan prinsip Pengendalian Hama Terpadu (PHT). PHT menggabungkan berbagai strategi dan praktik pengelolaan untuk menumbuhkan tanaman yang sehat dan meminimalkan penggunaan pestisida (FAO, 2023). Untuk menekan efek samping pestisida, sejumlah pendekatan telah digunakan untuk mengendalikan serangga hama termasuk di antaranya adalah pengendalian secara biologi dengan memanfaatkan bakteri entomopatogen (Sabbahi *et al.*, 2022; Azizoglu *et al.*, 2020). Bakteri entomopatogen banyak diteliti dan dikembangkan secara komersial untuk mengendalikan serangga hama (Lacey *et al.*, 2015; Azizoglu *et al.*, 2020).

Bakteri merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang dapat berperan dan memiliki potensi yang besar sebagai sumber toksin dan metabolit yang dapat digunakan dalam program pengendalian serangga. Salah satu di antaranya adalah bakteri *Serratia marcescens*, bakteri Gram negatif yang tergolong ke dalam famili Enterobacteriaceae. Bakteri ini biasanya hidup di tanah dan sering dikaitkan sebagai penyebab timbulnya infeksi pada serangga (Grimont &

Grimont, 2006). *S. marcescens* umum dikenal sebagai patogen penting pada serangga yang menyebabkan bakteremia yaitu suatu kondisi di mana bakteri berada dalam aliran darah sehingga dapat membunuh serangga secara cepat (Grimont & Grimont, 2006; Ishii *et al.*, 2014).

Penggunaan mikroorganisme entomopatogen dalam hal ini bakteri entomopatogen sebagai agen pengendali hama harus ramah lingkungan dan tidak berbahaya baik bagi manusia maupun spesies non-target. Menurut Sukmadewi dkk. (2017), bakteri yang berpotensi sebagai agens pengendali hayati harus diuji dan dipastikan terlebih dahulu bahwa tidak bersifat fitopatogen sehingga perlu dilakukan pengujian patogenisitas baik pengujian fitopatogenisitas terhadap tanaman maupun uji patogenisitas terhadap hewan dan manusia. Uji fitopatogenisitas terdiri atas uji hipersensitivitas untuk mengetahui potensi patogenik pada tanaman dan uji hemolisis darah untuk mengetahui potensi patogenik pada hewan dan manusia. Bakteri dapat berpotensi patogenik bagi tanaman, apabila pada uji hipersensitivitas menunjukkan gejala nekrosis pada titik inokulasi di daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) (Schaad *et al.*, 2001; Fitri dkk., 2023). Uji hemolisis darah dilakukan dengan menggunakan media agar darah. Zona bening yang terbentuk mengelilingi

koloni pada media menunjukkan bahwa bakteri mampu menghemolisis darah (Raymann *et al.*, 2018).

Pengujian sensitivitas terhadap antibiotik juga perlu dilakukan guna melihat sifat resistensi bakteri. Menurut Konecka *et al.* (2019), resistensi antibiotik dari strain tersebut harus dipertimbangkan karena kemungkinan terjadi penyebaran gen yang menyebabkan resistensi terhadap antibiotik. Bila strain *S. marcescens* yang resisten terhadap antibiotik dan berpotensi patogenik terhadap manusia digunakan dalam perlindungan tanaman, maka dapat menyebabkan infeksi pada manusia yang sulit disembuhkan, serta menyebabkan penyebaran gen resistensi secara horizontal.

Genus *Serratia* seperti *S. marcescens* dapat menghasilkan toksin serta faktor virulensi lain yang dapat bermanfaat dan memiliki potensi untuk dipertimbangkan sebagai sumber gen maupun toksin, serta penghasil senyawa yang bersifat insektisidal untuk pengendalian serangga hama (Pineda-Castellanos *et al.*, 2015; Itoh & Kimoto, 2019; Jupatanakul *et al.*, 2020; Niu *et al.*, 2022). Berbagai toksin dan enzim degradatif ekstraseluler seperti protease, lipase, karbohidrase dan kitinase, yang disekresi oleh *S. marcescens* dilaporkan sebagai faktor virulensi sehingga membuat bakteri ini sangat mematikan bagi serangga (Tao *et al.*, 2006, 2007; Aggarwal *et al.*, 2017; Azizoglu *et al.*, 2020; Jupatanakul *et al.*, 2020). Bakteri ini juga sering menjadi model penelitian terkait kitinase di mana degradasi kitin merupakan target utama untuk pengendalian serangga karena kitin memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan serangga (Itoh & Kimoto, 2019).

Priyatno dkk. (2011), melaporkan bahwa *S. marcescens* isolat Sm201102 yang diisolasi dari *Nilaparvata lugens* (Stål) terbukti bersifat patogenik terhadap *N. lugens*. *Serratia marcescens* pada konsentrasi 10^6 - 10^7 CFU/mL dapat menyebabkan kematian *N. lugens* hingga 65,6-78,2%. Dilaporkan pula oleh Pineda-Castellanos *et al.*, (2015) bahwa *S. marcescens* yang sebelumnya diisolasi dari *hemocoele* serangga *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) dapat menimbulkan efek *antifeedant* dan mortal terhadap larva *Phyllophaga blanchardi*. Hasil positif juga didapat dari penelitian yang dilakukan oleh Ishii *et al.* (2014) di mana injeksi supernatan bebas sel *S. marcescens* ke dalam aliran darah ulat sutra *Bombyx mori* (Linnaeus) meningkatkan jumlah sel imunosurveilans (hemosit) karena berkurangnya sifat adesif sel hemosit yang berakibat pada menurunnya imunitas seluler. Oleh karena itu, kekhawatiran akan

keamanan hayati dan kesehatan manusia dalam penggunaan bakteri *S. marcescens* sebagai agens biokontrol dapat diminimalisir dengan hanya memanfaatkan senyawa yang dihasilkannya.

Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan (BBPOPT) memiliki berbagai koleksi bakteri entomopatogen terduga sebagai *S. marcescens* yang belum teridentifikasi dan teruji keamanan hayatinya. Berdasarkan uraian latar belakang, maka identifikasi molekuler, uji keamanan hayati serta potensinya dalam mengendalikan serangga hama meliputi uji aktivitas kitinase dan uji aktivitas protease, uji hemolisis darah, uji hipersensitivitas, serta uji resistensi antibiotik perlu dilakukan, sebagai langkah awal pengembangan bakteri biokontrol pengendali hama tanaman.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Percobaan ini dilakukan dari Oktober 2023 hingga Februari 2024. Pengujian dilakukan di Laboratorium Agens Hayati dan Laboratorium Molekuler Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan (BBPOPT), Jatisari, Karawang.

Persiapan Isolat Bakteri terduga *Serratia marcescens*

Isolat bakteri yang telah murni dan diduga *S. marcescens* merupakan koleksi Laboratorium Agens Hayati Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan. Isolat bakteri disiapkan dalam media nutrisi agar. Isolat dengan kode Sm01-Sm12 berasal dari *N. lugens*, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen), *Mythimna unipuncta* (Haworth) dan *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) yang terinfeksi entomopatogen. Dua belas isolat bakteri yang diduga *S. marcescens* tersebut memiliki karakter morfologi koloni berwarna merah bata dengan bentuk koloni bulat margin *entire*, dan elevasi *umbonate* ketika dibiakkan pada media *Trypticase Soya Agar* (TSA) dengan suhu 37 °C selama 24 jam (American Society for Microbiology, 2007).

Identifikasi Bakteri secara Molekuler

Ekstraksi total genom DNA isolat bakteri dilakukan sesuai dengan protokol Qiamp DNA mini kit (Qiagen). Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan menggunakan PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads dengan primer universal bakteri 16S rRNA 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') dan primer reverse

1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Maina *et al.*, 2021). Program PCR yang digunakan sesuai dengan metode Karamipour *et al.* (2016) dengan modifikasi yaitu pemanasan awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Proses denaturasi, *annealing*, dan ekstensi dijalankan sebanyak 35 siklus. Ekstensi akhir dijalankan pada suhu 72 °C selama 10 menit. Setelah itu, akhir siklus dipertahankan pada suhu 4 °C selama 2 menit. DNA hasil PCR dengan primer 16S rRNA dielektroforesis dengan gel agarose. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi pada transiluminator UV (IK Laboratorium Molekuler BBPOPT, 2020a-2020d). Peruntutan hasil amplifikasi gen 16S rRNA merupakan layanan yang disediakan oleh Macrogen, Inc. Hasil peruntutan kemudian dianalisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) untuk mendapatkan urutan basa DNA yang terdapat dalam situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Uji Aktivitas Kitinase dan Protease

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) selama 24 jam. Uji aktivitas kitinase bakteri entomopatogen dilakukan dengan menggunakan media Colloidal Chitin Agar (CCA) (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,05 g *yeast extract*, 15 g agar dan 0,5% b/v koloidal kitin untuk setiap liter akuades), sedangkan uji aktivitas protease menggunakan media Skim Milk Agar (SMA) (20 g susu skim, 5 g tripton, 2,5 g *yeast extract*, 1 g *dextrose*, dan 20 g bacto agar per liter akuades). Kertas cakram setril (d= 5 mm, Whatmann No. 1) dicelupkan ke dalam kultur cair bakteri dan diletakkan pada media CCA atau SMA dengan menggunakan pinset steril, selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada 30 °C. Pengujian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua belas perlakuan (dua belas isolat bakteri) dan tiga ulangan. Bakteri yang menunjukkan aktivitas kitinolitik dan proteolitik ditandai dengan adanya zona bening di sekitar koloni (Frändberg, 1997). Penentuan nilai indeks kitinolitik (Cody, 1989) dan indeks proteolitik (Baehaki dkk., 2011), dihitung dengan rumus:

$$\text{Indeks kitinolitik (atau indeks proteolitik)} = \left(\frac{\text{Diameter zona bening (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}} \right)$$

Data dianalisis menggunakan ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila data yang didapatkan berpengaruh nyata maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test* atau DMRT) pada taraf 5% menggunakan program SPSS.

Uji Hemolisis Darah

Uji hemolisis darah dilakukan dengan menggoreskan isolat pada media agar darah. Isolat *Streptococcus pyogenes* sebagai kontrol positif, isolat bakteri entomopatogen dan selanjutnya isolat *Pseudomonas fluorescens* (sebagai kontrol negatif) digoreskan pada media agar darah. Biakan selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24-72 jam. Apabila terdapat zona bening pada media maka isolat tersebut mampu menghemolisis media agar darah (Raymann *et al.*, 2018).

Uji Hipersensitivitas Tanaman Tembakau terhadap Isolat Bakteri Entomopatogen

Uji hipersensitivitas dilakukan dengan menginokulasikan 200 µl inokulum isolat bakteri entomopatogen pada daun tanaman tembakau. Suspensi bakteri berumur 24 jam pada media LB dengan kepadatan 10⁶ CFU/ml disuntikkan pada jaringan epidermis di bagian permukaan bawah daun tembakau. Sebagai kontrol negatif adalah daun tembakau yang diinokulasikan dengan akuades steril. Gejala hipersensitif berupa adanya klorosis atau nekrosis pada daun tembakau yang diamati 24-72 jam setelah perlakuan (Fitri dkk., 2023; Fahy & Persley, 1983).

Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik

Uji sensitivitas terhadap antibiotik dilakukan dengan metode *disc diffusion* menggunakan kertas cakram antibiotik (Balouiri *et al.*, 2016). Kertas cakram antibiotik (Oxoid) pada pengujian ini terdiri atas 8 jenis antibiotik yaitu Chloramphenicol 30 µg, Doxycycline 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Sulphamethoxazole 25 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Gentamicin 10 µg, Amikacin 30 µg, dan Tetracycline 30 µg. Kultur cair bakteri pada media LB diambil dengan *cotton swab* steril, kemudian digoreskan pada media Muller Hinton Agar (MHA) secara menyilang dan menyeluruh. Kertas cakram antibiotik diletakkan pada media yang telah digores dengan inokulum bakteri (Hossain, 2024). Pada setiap cawan petri diletakkan kertas cakram dengan dua jenis antibiotik dan masing-masing jenis antibiotik terdiri dari tiga ulangan. Bakteri kemudian diinkubasi selama 24-48 jam. Zona hambat yang dihasilkan diukur untuk

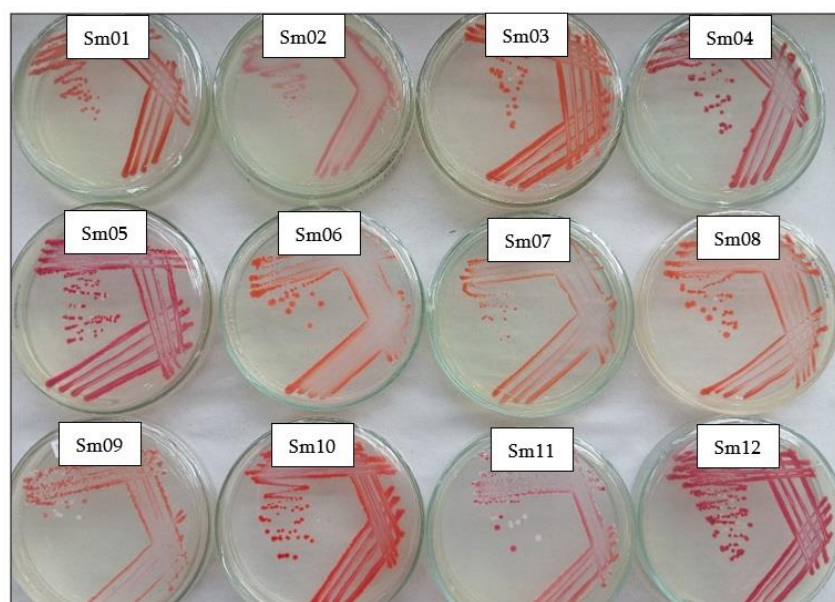
menentukan sensitivitas terhadap antibiotik, dan dikelompokkan menjadi sensitif (S) dan resisten (R) berdasarkan *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) *guideline* (EUCAST, 2024), dengan rincian diameter zona hambat (mm): Chloramphenicol 30 µg (S ≥ 17, R < 17), Doxycycline 30 µg (S ≥ 19, R < 19), Cefotaxime 30 µg (S ≥ 20, R < 17), Sulphamethoxazole 25 µg (S ≥ 14, R < 11), Ciprofloxacin 5 µg (S ≥ 25, R < 22), Gentamicin 10 µg (S ≥ 17, R < 17), Amikacin 30 µg (S ≥ 18, R < 18), dan Tetracycline 30 µg (S ≥ 19, R < 19).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Bakteri secara Molekuler

Isolat bakteri entomopatogen terduga *S. marcescens* yang telah diisolasi dari *N. lugens*, *L. migratoria manilensis*, *M. unipuncta* dan *S.*

frugiperda memiliki karakter morfologi koloni berwarna merah bata dengan bentuk koloni bulat margin *entire*, dan elevasi *umbonate* ketika dibiakkan pada media TSA dengan suhu 37 °C selama 24 jam (Gambar 1). Karakteristik morfologi serupa juga ditemukan pada bakteri yang menginfeksi *Anomala corpulenta* (*white grub*) yang mati dengan ciri tubuh berwarna merah dan setelah diidentifikasi secara molekuler merupakan *S. marcescens* (Tao *et al.*, 2022). Isolat *S. marcescens* yang diisolasi dari lingkungan sebagian besar memiliki pigmen merah yang disebut prodigiosin, tetapi sebagian besar isolat yang diisolasi dari infeksi klinis tidak berpigmen (Haddix *et al.*, 2008). Hal ini didukung oleh Herra & Falkiner (2023), bahwa *S. marcescens* yang tidak berpigmen ditemukan mendominasi infeksi nosokomial yang menyerang manusia dibandingkan dengan strain berpigmen.



Gambar 1. Penampakan koloni isolat bakteri terduga *S. marcescens* kode Sm01-Sm12 pada media media TSA.

Hasil analisis sekuen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa 11 isolat identik dengan *S. marcescens* dengan kesamaan terhadap *type culture* M59160 sebesar 99,60%-100%, sedangkan satu isolat yaitu Sm03 identik dengan *S. nematodiphila* dengan kesamaan terhadap *type culture* EU036987 sebesar 99,64% (Tabel 1). Keseluruhan isolat menunjukkan *query coverage* yang cukup tinggi pada kisaran 90%-100%, sedangkan *e-value* semua isolat menunjukkan angka 0 kecuali isolat Sm04 dan Sm12. *Query coverage* menunjukkan penyelarasan sekuens dalam basis data dan memengaruhi sensitivitas dan spesifisitas hasil penelusuran. *Query coverage* yang

tinggi meningkatkan peluang menemukan sekuens yang relevan, tetapi *query coverage* yang rendah dapat melewati kecocokan yang signifikan. *E-value* yang lebih rendah dalam hal ini nilai 0 menunjukkan penyelarasan yang lebih signifikan sehingga menunjukkan probabilitas lebih tinggi bahwa sekuens tersebut memiliki asal usul evolusi yang sama, sedangkan *e-value* yang lebih tinggi pada isolat Sm04 dan Sm12 menunjukkan bahwa penyelarasan tersebut lemah (Cheryl *et al.*, 2011). Hal ini dimungkinkan karena data hasil sekuens dari kedua isolat tersebut yang kurang optimal.

Tabel 1. Hasil identifikasi molekuler isolat bakteri entomopatogen dengan metode PCR dan BLAST

Kode Isolat	Asal Serangga	Nama Ilmiah	Query Coverage	E-value	Type Culture Accession	Kesamaan dengan type culture (%)
Sm01	<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	100%	0	M59160	99,87%
Sm02	<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	100%	0	M59160	99,79%
Sm03	<i>Nilaparvata lugens</i>	<i>Serratia nematodiphila</i> strain PK50	100%	0	EU036987	99,64%
Sm04	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	91%	4,00E-138	M59160	99,87%
Sm05	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain BSFL-6	100%	0	M59160	100%
Sm06	<i>Mythimna unipuncta</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	99%	0	M59160	99,87%
Sm07	<i>Locusta migratoria manilensis</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> Db11	99%	0	M59160	99,60%
Sm08	<i>Locusta migratoria manilensis</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain TS4-NA2	100%	0	M59160	99,65%
Sm09	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	100%	0	M59160	99,87%
Sm10	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	100%	0	M59160	99,87%
Sm11	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880	99%	0	M59160	99,87%
Sm12	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain RMCH-M16-N	90%	2,00E-109	M59160	99,60%

Pada penelitian ini, 11 isolat *S. marcescens* diperoleh dari serangga hama berbagai ordo yaitu Hemiptera, Lepidoptera, dan Orthoptera. Hal ini sesuai dengan Grimont & Grimont (2006), bahwa *S. marcescens* dapat ditemukan dan sering menginfeksi serangga yang termasuk dalam berbagai spesies dan genus dari ordo Orthoptera, Isoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, dan Diptera. Adapun *S. nematodiphila* merupakan bakteri yang bersimbiosis dengan nematoda entomopatogen dari genus *Rhabditidae* serta berperan dalam membantu nematoda tersebut untuk menginfeksi serangga hama (Zhang *et al.*, 2009).

Studi menunjukkan bahwa *S. marcescens* dapat secara signifikan mengurangi tingkat kelangsungan hidup pada larva berbagai spesies,

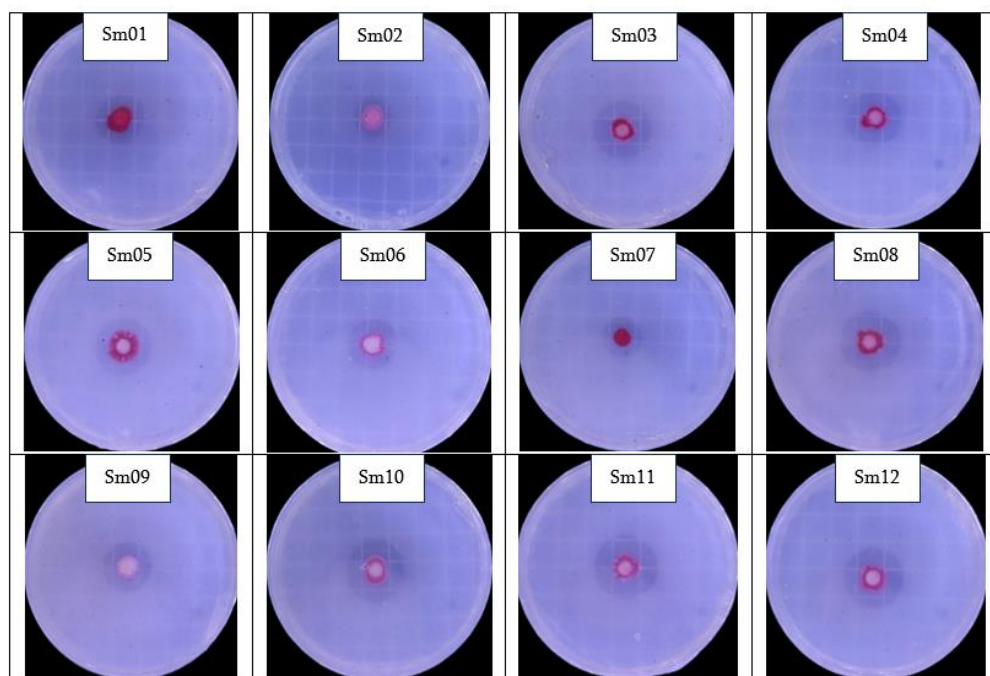
termasuk *Plodia interpunctella* dan *Ephestia kuehniella*, dengan mortalitas mencapai 66,3% (Bidari *et al.*, 2018; Mohan *et al.*, 2011). Pada penelitian Zhong *et al.* (2023), bakteri yang diisolasi dari pupa ulat hongkong *T. molitor* dan dilakukan identifikasi secara molekuler menggunakan primer universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') teridentifikasi sebagai *S. marcescens*. Penelitian lain yang dilakukan oleh El-Sayed *et al.* (2024), *S. marcescens* juga berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari larva *S. frugiperda* dengan accession number OR793165 dan diberi nama *S. marcescens* strain NRC408. Isolat ini menunjukkan aktivitas enzim kitinase yang tinggi yaitu 250 unit/miligram protein dan memiliki potensi

dalam membunuh larva *S. frugiperda*, mengganggu perkembangan, malformasi, dan mengurangi populasi larva.

Uji Aktivitas Kitinase dan Protease Bakteri Entomopatogen

Potensi bakteri dalam memproduksi kitinase dapat dilihat dari indeks kitinolitik yang ditentukan berdasarkan nisbah antara diameter zona bening (halo) dengan diameter koloni bakteri (Suryadi dkk., 2013). Zona bening terbentuk akibat kitinase yang disekresikan ke luar sel bakteri untuk memecah makromolekul kitin menjadi molekul kitin yang lebih kecil (Gohel *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2000). Keseluruhan isolat bakteri pada pengujian ini menunjukkan adanya aktivitas kitinase dengan ditandai terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Gambar 2). Indeks kitinolitik dari 12 isolat bakteri berkisar antara 1,37 hingga 2,15 (Tabel 2). Isolat Sm09

menghasilkan indeks kitinolitik paling tinggi yaitu 2,15 dan berbeda nyata dengan semua isolat yang lain, sedangkan isolat Sm02 menunjukkan indeks kitinolitik paling rendah dan tidak berbeda nyata dengan Sm04 dan Sm06. Isolat Sm03 memiliki indeks kitinolitik yang berbeda nyata dengan Sm12, sedangkan isolat Sm01, Sm03, Sm07, Sm08, Sm10, dan Sm11 tidak berbeda nyata satu sama lain. Pada penelitian Halim *et al.* (2018), *S. marcescens* yang diinkubasi 48 jam pada media CCA menghasilkan indeks kitinolitik sebesar 2,203, hasil ini hampir sama dengan indeks kitinolitik isolat Sm09 yaitu 2,15. Aggarwal *et al.* (2017) menyatakan bahwa semakin besar zona bening yang terbentuk maka semakin tinggi indeks kitinolitik dan semakin tinggi pula aktivitas enzim kitinase yang disekresikan oleh bakteri tersebut, namun faktor lain seperti suhu, waktu inkubasi, pH, dan strain bakteri juga mempengaruhi aktivitas kitinolitik *S. marcescens*.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas enzim kitinase yang dihasilkan oleh 12 isolat bakteri kode Sm01-Sm12.

Menurut Itoh & Kimoto (2019), bakteri penghasil kitinase dapat mendegradasi kitin yang merupakan target utama untuk pengendalian serangga karena kitin memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan perkembangan serangga. Kitinase mampu secara efektif memecah ikatan glikosidik pada polimer kitin yang terdapat pada membran peritrofik serangga (Tetreau & Wang, 2019). Kitin merupakan komponen yang sangat penting bagi serangga karena berperan penting dalam

pertumbuhan dan perkembangan serangga. Kitin juga menjadi penyusun epidermis, trakhea dan membran peritrofik pada serangga (Zhu *et al.*, 2016; Tetreau & Wang, 2019). Apabila sintesis atau degradasi kitin terganggu, misalnya pada membran peritrofik dapat menyebabkan lewatnya semua jenis toksin pada *midgut*. Hal ini menyebabkan beberapa bakteri dan toksinnya dapat mencapai sel endotel *midgut* dan menjadi patogen bagi serangga (Tetreau & Wang, 2019).

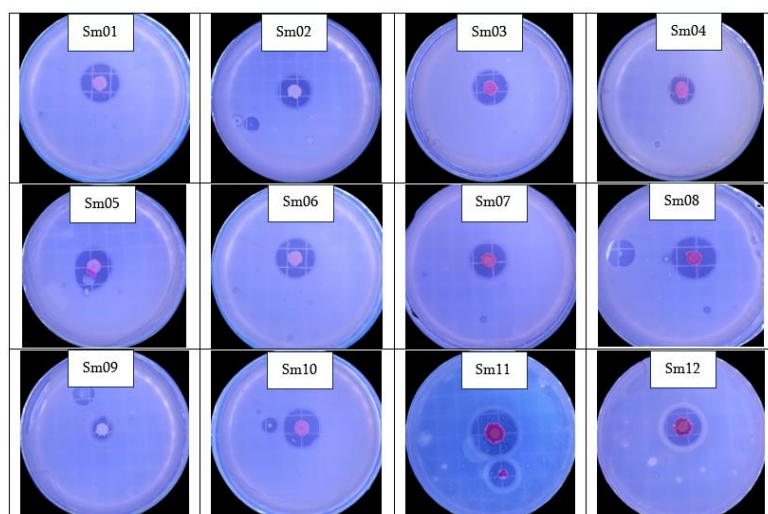
Tabel 2. Indeks kitinolitik, indeks proteolitik, dan hemolisis darah 12 isolat bakteri serta reaksi hipersensitif tanaman tembakau

Kode Isolat	Indeks Kitinase	Indeks Proteolitik	Hemolisis Darah	Reaksi Hipersensitif
Sm01	1,77 cde	2,22 bc	-	+
Sm02	1,37 a	2,09 bc	-	-
Sm03	1,63 bcd	2,23 bc	+	+
Sm04	1,43 ab	2,36 bc	+	-
Sm05	1,68 cde	2,26 bc	+	+
Sm06	1,84 ab	2,18 bc	-	+
Sm07	1,86 ab	2,44 c	-	-
Sm08	1,82 de	2,42 c	-	+
Sm09	2,15 f	1,52 a	-	+
Sm10	1,88 de	2,19 bc	+	-
Sm11	1,74 cde	1,87 ab	-	-
Sm12	1,90 e	2,08 bc	+	+

Keterangan: Angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama menandakan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antar isolat, berdasarkan Uji Jarak Berganda Duncan dengan tingkat signifikansi 5%.

Senyawa lain yang dihasilkan bakteri dan berpotensi dalam membunuh serangga adalah protease. Protease adalah enzim hidrolitik yang memecah protein menjadi peptida kecil dan asam amino (Khan & Ahmad, 2021). Menurut Pineda-Castellanos *et al.* (2015), skrining aktivitas protease dapat dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media SMA. Bakteri dengan aktivitas protease ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media (Gambar 3). Pada pengujian aktivitas proteolitik, 12 isolat bakteri menunjukkan adanya aktivitas proteolitik dengan indeks proteolitik berkisar antara

1,52 hingga 2,44 (Tabel 2). Indeks proteolitik keseluruhan isolat lebih tinggi dibanding indeks kitinolitiknya, kecuali isolat Sm09 di mana indeks kitinolitik lebih tinggi dibanding indeks proteolitiknya. Aktivitas proteolitik tertinggi ditunjukkan oleh isolat Sm07 dan terendah adalah isolat Sm09. Isolat Sm07 menunjukkan aktivitas proteolitik paling tinggi dan tidak berbeda nyata dengan isolat lain kecuali Sm09 dan Sm11. Isolat Sm09 menunjukkan aktivitas proteolitik paling rendah dan tidak berbeda nyata dengan Sm11, tetapi berbeda nyata dengan isolat lainnya.



Gambar 3. Hasil uji aktivitas protease yang dihasilkan oleh 12 isolat bakteri kode Sm01-Sm12.

Bakteri yang bersifat proteolitik sangat berpotensi bagi pengendalian serangga hama. Harrison & Bonning (2010) menyatakan bahwa target aktivitas protease yang disekresikan oleh bakteri

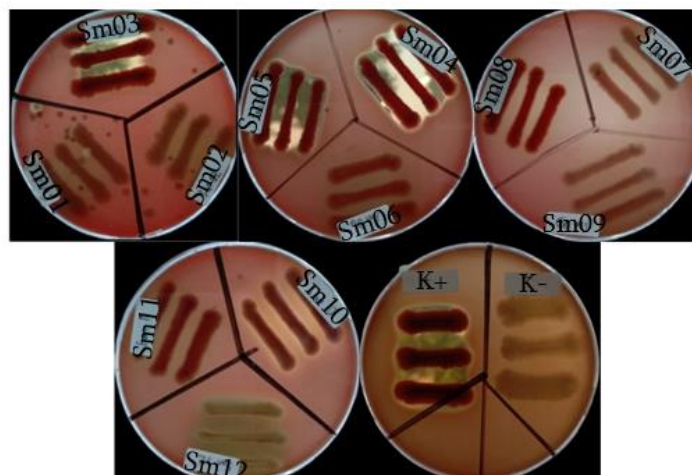
adalah *midgut* serangga hingga *hemocoel* (rongga tubuh) dan kutikula. Selain itu, protease dapat menekan respon imun inang, misalnya protease IV yang disekresikan oleh *Pseudomonas aeruginosa*

terlibat dalam faktor virulensi yang menyebabkan melanisasi dan kematian larva *T. molitor* tanpa aktivasi peptide antimikrobia (AMP) (Park *et al.*, 2014). Penelitian Ishii *et al.*, (2014) menunjukkan bahwa seralisin metalloprotease pada *S. marcescens* menekan sel imun pada larva ulat sutra, sehingga menurunkan imunitas seluler. Seralisin protease yang diproduksi oleh *S. marcescens* FS14 memiliki sifat termostabil dan aktivitas insektisidal terhadap larva *Helicoverpa armigera* (Wu *et al.*, 2022).

Uji Hemolisis Darah

Bakteri patogen yang tumbuh pada media agar darah akan memanfaatkan sel darah atau serum darah sebagai sumber nutrisi. Aktivitas bakteri yang

memanfaatkan sel darah menyebabkan sel darah pecah (hemolisis). Terjadinya hemolisis pada medium ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar pertumbuhan koloni bakteri pada media agar darah (Buxton, 2005). Bakteri non-hemolitik umumnya dianggap aman, sedangkan strain dengan aktivitas hemolitik dianggap patogenik terhadap manusia dan ternak. Mikroorganisme yang menunjukkan aktivitas hemolitik dapat merusak sel darah merah karena menyebabkan pelepasan hemoglobin. Hal ini kaitannya dengan produksi hemolisin yang dapat memiliki efek sitolitik pada sel inang dan penurunan kadar hemoglobin (Orf & Cunningham, 2015; Golnari *et al.*, 2024).



Gambar 4. Hasil uji hemolisis darah terhadap 12 isolat bakteri dengan waktu inkubasi 72 jam.

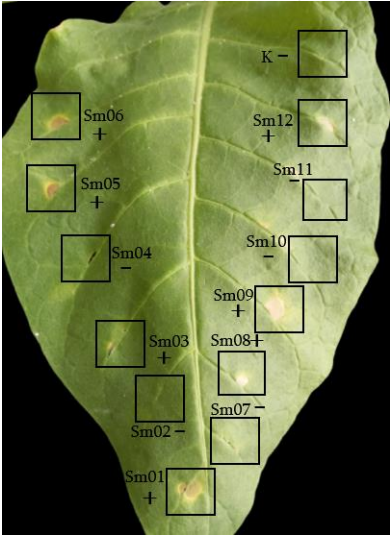
Hasil pengamatan aktivitas hemolisis dimulai pada jam ke-24 inkubasi dengan hasil hemolisis paling jelas diamati pada jam ke-72 inkubasi (Gambar 4). Hasil pengujian hemolisis darah terhadap 12 isolat bakteri menunjukkan bakteri yang mampu menghemolisis darah yaitu isolat Sm03, Sm 04, Sm05, Sm10, dan Sm12, sedangkan isolat Sm01, Sm02, Sm06, Sm07, Sm08, Sm09, dan Sm11 diketahui tidak menunjukkan sifat hemolisis darah (Tabel 2). Kontrol positif yang digunakan pada pengujian ini yaitu *S. pyogenes* yang bersifat beta-hemolisis, sedangkan kontrol negatif yang digunakan yaitu *P. fluorescens* yang tidak menunjukkan adanya aktivitas hemolisis. Sebagian besar strain *S. marcescens* diketahui mampu menghemolisis darah. Akan tetapi, tidak semua bakteri *S. marcescens* mampu menghemolisis darah dan bersifat patogenik, seperti pada penelitian Sutio *et al.* (2023), bakteri *S. marcescens* strain NPKC3_2_21 yang diuji hemolisis darah, uji dermal akut, dan uji oral akut pada tikus putih menunjukkan

bakteri tersebut bersifat non-patogenik. Pada penelitian ini, isolat Sm01, Sm02, Sm06, Sm07, Sm08, Sm09, dan Sm11 bersifat non-patogenik terhadap ternak dan manusia karena ketidakmampuannya dalam menghemolisis darah.

Uji Hipersensitivitas Tanaman Tembakau terhadap Isolat Bakteri Entomopatogen

Uji hipersensitivitas merupakan salah satu uji penting untuk mengetahui sifat patogenik bakteri. Semua bakteri fitopatogen menghasilkan reaksi hipersensitif (HR) pada jaringan mesofil daun. Pengujian hipersensitivitas dapat dilakukan dengan protokol standar menggunakan tanaman tembakau atau bunga pukul empat (Umesha *et al.*, 2008). Pada pengamatan yang dilakukan 24-72 jam setelah inokulasi (Gambar 5 dan Tabel 2), diketahui 7 isolat menyebabkan reaksi hipersensitif ditandai dengan adanya gejala nekrosis dan klorosis yaitu Sm01, Sm03, Sm05, Sm06, Sm08, Sm09, dan Sm12. Hal itu

menandakan bahwa isolat-isolat tersebut bersifat patogenik terhadap tanaman. Seperti halnya pada penelitian Sedighian *et al.*, (2018), bakteri *S. marcescens* yang bersifat patogenik menimbulkan reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau 24 jam pasca-inokulasi, serta merupakan penyebab klorosis dan nekrosis pada daun labu *Cucurbita pepo* var. *styriaca* di Iran. Uji patogenisitas pada tanaman labu berumur 25 hari menunjukkan gejala yang terdiri dari bintik-bintik nekrotik yang dikelilingi oleh lingkaran klorosis yang muncul 5–10 hari pasca-inokulasi. Lima isolat lain yaitu Sm02, Sm04, Sm07, Sm10, dan Sm11 tidak menimbulkan reaksi hipersensitif. Hal ini berarti bahwa isolat-isolat tersebut tidak bersifat patogenik bagi tanaman.



Gambar 5. Hasil uji hipersensitivitas 12 isolat bakteri pada 72 jam setelah inokulasi.

Tanaman tembakau dipilih sebagai model pada uji hipersensitivitas karena tanaman tembakau mampu mematikan jaringan di sekitar area yang diinokulasikan bakteri sebagai reaksi ketahanan terhadap bakteri. Selain itu, daun tembakau mampu melokalisasi serangan bakteri patogen yang menginfeksi sehingga gejala yang muncul dari reaksi hipersensitif lebih jelas (Umesha *et al.*, 2008).

Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik

Pengujian sensitivitas terhadap antibiotik perlu dilakukan guna melihat sifat resistensi bakteri. Menurut Konecka *et al.* (2019), resistensi antibiotik dari strain tersebut harus dipertimbangkan karena kemungkinan terjadi penyebaran gen yang menyebabkan resistensi terhadap antibiotik. Penggunaan strain *S. marcescens* yang resisten terhadap antibiotik dan berpotensi patogenik terhadap manusia dan ternak, dalam perlindungan tanaman dapat menyebabkan infeksi pada manusia yang sulit disembuhkan, serta menyebabkan penyebaran gen resistensi secara horizontal. Delapan jenis antibiotik digunakan dalam penelitian ini yaitu Chloramphenicol 30 µg, Doxycycline 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Sulphamethoxazole 25 µg, Ciprofloxacin 5 µg, Gentamicin 10 µg, Amikacin 30 µg, dan Tetracycline 30 µg, merupakan jenis antibiotik yang sering digunakan dalam pengobatan terhadap infeksi *S. marcescens* (Zivkovic Zaric *et al.*, 2023).

Tabel 3. Hasil uji sensitivitas 12 isolat bakteri terhadap 8 jenis antibiotik

Kode Isolat	Sensitivitas terhadap Antibiotik							
	C 30 µg	DO 30 µg	CTX 30 µg	SXT 25 µg	CIP 5 µg	CN 10 µg	AK 30 µg	TE 30 µg
Sm01	S	S	S	S	S	S	S	S
Sm02	S	S	S	S	S	S	S	S
Sm03	S	R	S	S	S	S	R	R
Sm04	S	R	S	S	S	S	S	R
Sm05	R	R	S	S	S	S	S	R
Sm06	S	R	S	S	S	S	S	R
Sm07	S	S	S	S	S	S	S	S
Sm08	S	S	S	S	S	S	R	R
Sm09	S	R	S	S	S	R	S	R
Sm10	R	R	S	S	S	S	S	R
Sm11	S	R	S	S	S	S	S	R
Sm12	S	R	S	S	S	S	S	R

Keterangan: C= Chloramphenicol; DO= Doxycycline; CTX= Cefotaxime; SXT= Sulphamethoxazole; CIP= Ciprofloxacin; CN= Gentamicin; AK= Amikacin; TE= Tetracycline; S= Sensitif; R= Resisten. Analisis dilakukan berdasarkan diameter zona hambat dan dibandingkan dengan *Breakpoint tables for interpretation of MICs* (EUCAST, 2024).

Dari hasil pengujian pengukuran diameter zona bening dan analisis dengan *Breakpoint tables for interpretation of MICs* (EUCAST, 2024) diketahui bahwa 12 isolat sensitif terhadap antibiotik Cefotaxime 30 µg, Sulphamethoxazole 25 µg, dan Ciprofloxacin 5 µg. Isolat Sm01, Sm02, dan Sm07 sensitif terhadap semua jenis antibiotik yang diujikan. Resistensi tertinggi ditunjukkan pada antibiotik Doxycycline 30 µg sebanyak 8 isolat dan 9 isolat resisten terhadap Tetracycline 30 µg. (Tabel 3). Hasil ini berkorelasi positif dengan penelitian Zivkovic Zaric *et al.* (2023), bahwa sebagian besar strain *S. marcescens* sensitif terhadap antibiotik Gentamicin, Cotrimoxazole, Amikacin, Ciprofloxacin, dan Cefotaxime. Doxycycline merupakan antibiotik generasi kedua dari Tetracycline. Hal ini sesuai dengan Stock *et al.* (2003) bahwa sebagian besar strain *S. marcescens* memiliki sifat resistensi alami terhadap Penicillin dan generasi pertama-kedua dari Cephalosporin, Tetracycline, Macrolide, Nitrofurantoin, dan Colistin.

Pada penelitian ini, dari serangkaian pengujian yang dilakukan untuk mengetahui potensi dan keamanan hayati dari kedua belas bakteri ditemukan tiga isolat bakteri yang berpotensi dan dianggap aman untuk digunakan sebagai agen biokontrol, yaitu Sm02, Sm07, dan Sm11. Ketiga isolat ini menunjukkan aktivitas kitinolitik dan proteolitik secara kualitatif, serta terbukti tidak bersifat patogenik terhadap manusia, hewan, ataupun tanaman. Selanjutnya, dalam proses pengembangannya, pengujian aktivitas kitinolitik dan proteolitik dapat dilakukan secara kuantitatif, serta menguji efeknya terhadap serangga hama, baik menggunakan bakteri secara langsung maupun dengan memanfaatkan metabolit yang dihasilkan. Isolat lain juga menunjukkan aktivitas kitinolitik dan proteolitik, namun dari segi keamanan hayati menunjukkan adanya sifat patogen terhadap tanaman atau manusia dan hewan. Meskipun demikian, isolat-isolat tersebut masih dapat dimanfaatkan sebagai sumber gen kitinase dan protease untuk pengujian dan pengembangan lebih lanjut dalam upaya pengendalian serangga hama.

SIMPULAN

Hasil identifikasi 12 isolat bakteri (kode Sm01-Sm12) yang diduga *Serratia marcescens* menunjukkan bahwa 11 isolat merupakan strain *Serratia marcescens*, sedangkan isolat Sm03 adalah *Serratia nematodiphila*. Keseluruhan isolat diketahui

memiliki aktivitas kitinolitik dan proteolitik. Isolat Sm01, Sm02, Sm06, Sm07, Sm08, Sm09 dan Sm11 diketahui tidak menunjukkan sifat hemolisis darah. Hasil uji hipersensitivitas tanaman tembakau menunjukkan isolat Sm02, Sm04, Sm07, Sm10, dan Sm11 tidak menimbulkan reaksi hipersensitif. Uji sensitivitas terhadap antibiotik menunjukkan bahwa isolat Sm01, Sm02 dan Sm07 sensitif terhadap semua jenis antibiotik yang diujikan. Dari 12 isolat yang diidentifikasi, diuji keamanan hayati serta potensinya sebagai pengendali serangga hama, diketahui bahwa isolat Sm02, Sm07 dan Sm11 merupakan entomopatogen *Serratia marcescens* dan dapat diuji lebih lanjut untuk pengendalian serangga hama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian, Kementerian Pertanian atas pendanaan penelitian, Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan Direktorat Jenderal Tanaman Pangan atas penyediaan sarana dan prasarana penelitian serta berbagai pihak yang turut membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, C, S Paul, V Tripathi, B Paul, and MdA Khan. 2017. Characterization of putative virulence factors of *Serratia marcescens* strain SEN for pathogenesis in *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 143: 115–123. DOI: 10.1016/j.jip.2016.12.004.
- American Society for Microbiology. 2007. Colony Morphology. Tersedia online pada: <https://asm.org/Image-Gallery/Colony-Morphology> (diakses 16 Agustus 2023).
- Azizoglu, U, GS Jouzani, N Yilmaz, E Baz, and D Ozkok. 2020. Genetically modified entomopathogenic bacteria, recent developments, benefits and impacts: A review. *Science of The Total Environment*. 734: 139169. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139169.
- Baehaki, A, Rinto, dan A Budiman. 2011. Karakterisasi protease dari isolat bakteri asal tumbuhan rawa dari Indralaya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 15(1): 59-65.
- Balouiri, M, M Sadiki, and SK Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical*

- Analysis. 6(2): 71–79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Bidari, F., M Shams-Bakhsh, and M Mehrabadi. 2018. Isolation and characterization of a *Serratia marcescens* with insecticidal activity from *Polyphylla olivieri* (Col.: Scarabaeidae). Journal of Applied Entomology. 142(1-2): 162–172. DOI: 10.1111/jen.12421.
- Buxton, R. 2005. Blood agar plates and hemolysis protocols. American Society For Microbiology. Tersedia online pada: <https://asm.org/Protocols/Blood-Agar-Plates-and-Hemolysis-Protocols> (diakses_20 April 2024).
- Cody, RM. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. Current Microbiology. 19: 201–205.
- Cheryl, A Kerfeld, M Kathleen, and Scott. 2011. Using BLAST to teach "E-value-tionary" concepts. PLOS Biology. 9(2). DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.1001014
- El-Sayed, GM, MTH Emam, MA Hammad, and SH Mahmoud. 2024. Gene cloning, heterologous expression, and in silico analysis of chitinase B from *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera frugiperda* larvae infesting maize crops. Molecules. 29: 1466. DOI: 10.3390/molecules29071466.
- EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). 2024. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. Tersedia online pada: <http://www.eucast.org> (diakses 15 Februari 2024).
- Fahy, PC, and GJ Persley. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Sydney.
- FAO. 2023. Integrated Pest Management (IPM), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Tersedia online pada: <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/ipm/integrated-pest-management/en/> (diakses 12 April 2024).
- Fitri, E, F Widiyanti, dan E Yulia. 2023. Kejadian dan uji hipersensitivitas bakteri yang berasosiasi dengan penyakit busuk batang jagung di Sumbawa Nusa Tenggara Barat. Jurnal Agrikultura. 34(2): 210-217. DOI: 10.24198/agrikultura.v34i2.48717.
- Frändberg, E. 1997. Antifungal Compounds of Chitinolytic Bacteria from Grain Ecosystems. Doctor's dissertation. ISSN 1401-6249. ISBN 91-576-5275-9.
- Gohel, V, A Singh, M Vimal, and P Ashwini. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal Biotech. 5(2): 54-72. DOI: 10.3390/toxins2050935.
- Golnari, M, N Bahrami, Z Milanian, M Rabbani Khorasgani, MA Asadollahi, R Shafiei, and SS-A Fatemi. 2024. Isolation and characterization of novel *Bacillus* strains with superior probiotic potential: comparative analysis and safety evaluation. Scientific Reports. 14: 1457. DOI: 10.1038/s41598-024-51823-z.
- Grimont, F, and PAD Grimont. 2006. The genus *Serratia*. The Prokaryotes. 219–244. DOI: 10.1007/0-387-30746-x_11.
- Haddix, PL, S Jones, P Patel, S Burnham, K Knights, JN Powell, and A LaForm. 2008. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology. 190(22): 7453–7463. DOI: 10.1128/JB.00909-08.
- Halim, Y, H Hardoko, R Handayani, and V Lucida. 2018. Optimum conditions for N-Acetyl Glucosamine production from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) shell by *Serratia marcescens*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 11(12): 488. DOI: 10.22159/ajpcr.2018.v11i12.28956.
- Harrison, RL, and BC Bonning. 2010. Proteases as insecticidal agents. Toxins. 2(5): 935–953. DOI: 10.3390/toxins2050935.
- Herra, C. and Falkiner, F. 2023. *Serratia marcescens*. Tersedia online pada <http://www.antimicrobe.org/b26.asp> (diakses pada 15 Februari 2024).
- Hossain, TJ. 2024. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. European Journal of Microbiology and Immunology. 14(2): 97–115. DOI: 10.1556/1886.2024.00035.
- IK Laboratorium Molekuler BBPOPT. 2020a. IK-MOL-P-01 Instruksi Kerja Pelaksanaan Ekstraksi DNA Kultur Bakteri/Cendawan. Balai Besar Peramalan OPT Jatisari.
- IK Laboratorium Molekuler BBPOPT. 2020b. IK-MOL-P-22 Instruksi Kerja Pelaksanaan Amplifikasi DNA menggunakan Cytiva ready

- to go PCR bead. Balai Besar Peramalan OPT Jatisari.
- IK Laboratorium Molekuler BBPOPT. 2020c. IK-MOL-P-06 Instruksi Kerja Pelaksanaan Elektroforesis DNA. Balai Besar Peramalan OPT Jatisari.
- IK Laboratorium Molekuler BBPOPT. 2020d. IK-MOL-P-014 Instruksi Kerja Visualisasi DNA dengan Uvitec. Balai Besar Peramalan OPT Jatisari.
- Ishii, K, T Adachi, T Hara, H Hamamoto, and K Sekimizu. 2014. Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Invertebrate Pathology. 117: 61–67. DOI: 10.1016/j.jip.2014.02.001.
- Itoh, T, and H Kimoto. 2019. Bacterial chitinase system as a model of chitin biodegradation. Advances in Experimental Medicine and Biology. 1142: 131–151. DOI: 10.1007/978-981-13-7318-3_7.
- Jupatanakul, N, J Pengon, SMG Selisana, W Choksawangkarn, N Jaito, A Saeung, R Bunyong, N Posayapisit, K Thammatinna, N Kalpongngukul, K Aupalee, T Pisitkun, and S Kamchonwongpaisan. 2020. *Serratia marcescens* secretes proteases and chitinases with larvicidal activity against *Anopheles dirus*. Acta Tropica. 105686. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105686.
- Khan, MA, and W Ahmad. 2021. Microbes for Sustainable Insect Pest Management Hydrolytic Enzyme and Secondary Metabolite Vol 2. Series of Sustainability in Plant and Crop Protection. Springer Cham. DOI: 10.1007/978-3-030-67231-7.
- Konecka, E, J Mokracka, S Krzysińska, and A Kaznowski. 2019. Evaluation of the pathogenic potential of insecticidal *Serratia marcescens* strains to humans. Polish Journal of Microbiology. 68(2): 185–191. DOI: 10.21307/pjm-2019-018.
- Maina, J, JM Mathara, GM Kikuvi, and E Wafula. 2021. Isolation and identification of bacteriocin-producing *Bacillus* spp from *Rastrineobola argentea* (Omena) with activity against bovine mastitis bacterial pathogens. Journal of Food Security. 9(2):62–75. DOI: 10.12691/jfs-9-2-4.
- Mohan, M, G Selvakumar, SN Sushil, JC Bhatt, and HS Gupta. 2011. Entomopathogenicity of endophytic *Serratia marcescens* strain SRM against larvae of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27(11):2545–2551. DOI: 10.1007/s11274-011-0724-4.
- Niu, H, Y Sun, Z Zhang, D Zhao, N Wang, L Wang, and H Guo. 2022. The endophytic bacterial entomopathogen *Serratia marcescens* promotes plant growth and improves resistance against *Nilaparvata lugens* in rice. Microbiological Research. 256: 126956. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126956.
- Orf, K, and AJ Cunningham. 2015. Infection-related hemolysis and susceptibility to Gram-negative bacterial co-infection. Frontiers Microbiology. 6: 666. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00666.
- Park, S., JH Lee, and HK Lee. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. Journal of Microbiology. 38: 24–229.
- Park, S, S Kim, Y So, H Park, X Li, DH Yeom, M Lee, B Lee, and J Lee. 2014. Protease IV, a quorum sensing-dependent protease of *Pseudomonas aeruginosa* modulates insect innate immunity. Molecular Microbiology. 94(6): 1298–1314. DOI: 10.1111/mmi.12830.
- Pineda-Castellanos, M, Z Rodríguez-Segura, F Villalobos, L Hernández, L Lina, and M Nuñez-Valdez. 2015. Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). Pathogens. 4(2): 210–228. DOI: 10.3390/pathogens4020210.
- Priyatno, TP, YA Dahliani, Y Suryadi, IM Samudra, DN Susilowati, I Rusmana, BS Wibowo, dan C Irwan. 2011. Identifikasi entomopatogen bakteri merah pada wereng batang coklat (*Nilaparvata lugens* Stal.). Jurnal Agro Biogen. 7(2): 85–95. DOI: 10.21082/JBIO.V7N2.2011.P85-95.
- Raymann, K, KL Coon, Z Shaffer, S Salisbury, and NA Moran. 2018. Pathogenicity of *Serratia marcescens* strains in honey bees. mBio. 9(5). DOI: 10.1128/mbio.01649-18.
- Sabbahi, R, V Hock, K Azzaoui, S Saoiabi, and B Hammouti. 2022. A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. Journal of Agriculture and Food Research. 10. DOI: 10.1016/j.jafr.2022.100376.

- Schaad, NW, JB Jones, and W Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Edition. The American Phytopathological Society. St Paul.
- Sedighian, N, SM Taghavi, E Osdaghi, and M Shams-Bakhsh. 2018. *Serratia marcescens* associated with squash leaf chlorosis and necrotic spots in Iran. Journal of Plant Pathology. 100(1): 85–89. DOI: 10.1007/s42161-018-0006-1.
- Stock, I, T Grueger, and B Wiedemann. 2003. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. International Journal of Antimicrobial Agents. 22(1): 35–47. DOI: 10.1016/s0924-8579(02)00163-2.
- Sukmadewi, DKT, I Anas, R Widyastuti, dan A Cintaresmini. 2017. Uji fitopatogenitas, hemolisis serta kemampuan mikrob dalam melarutkan fosfat dan kalium. Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan. 19(2): 68-73. DOI: 10.29244/jitl.19.2.68-73.
- Suryadi, Y, TP Priyatno, DN Susilowati, IM Samudra, N Yudhistira, dan ED Purwakusumah. 2013. Isolasi dan karakterisasi kitinase asal *Bacillus cereus* 11 UJ. Jurnal Biologi Indonesia. 9(1): 51-62.
- Sutio, G, A Nur Afifah, R Maharani, and M Basri. 2023. *Serratia marcescens* strain NPKC3_2_21 as endophytic phosphate solubilizing bacteria and entomopathogen: Promising combination approach as rice biofertilizer and biopesticide. Biodiversitas. 24(2): 901–909. DOI: 10.13057/biodiv/d240228.
- Tao, A, T Wang, F Pang, X Zheng, C Ayra-Pardo, S Huang, R Xu, F Liu, J Li, Y Wei, Z Wang, Q Niu, and D Li. 2022. Characterization of a novel chitinolytic *Serratia marcescens* strain TC-1 with broad insecticidal spectrum. AMB Express. 12(1): 100. DOI: 10.1186/s13568-022-01442-6.
- Tao, K, Z Long, K Liu, Y Tao, and S Liu. 2006. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. Current Microbiology. 52: 45–49. DOI: 10.1007/s00284-005-0089-8.
- Tao, K, X Yu, Y Liu, G Shi, S Liu, and T Hou. 2007. Cloning, expression, and purification of insecticidal protein Pr596 from locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. Current Microbiology. 55: 228–233. DOI: 10.1007/s00284-007-0096-z.
- Tetreau, G, and P Wang. 2019. Chitinous Structures as Potential Targets for Insect Pest Control. Springer. 273-292. DOI: 10.1007/978-981-13-7318-3_13.
- Umesha, S, PA Richardson, P Kong, and CX Hong. 2008. A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 72(1): 95–97.
- Wu, J, X Zhang, MH Bashir, and S Ali. 2022. Lethal and sublethal toxicity assessment of Cyclosporin C (a fungal toxin) against *Plutella xylostella* (L.). Toxins. 14: 514. DOI: 10.3390/toxins14080514.
- Zhang, CX, SY Yang, MX Xu, J Sun, H Liu, JR Liu, H Liu, F Kan, J Sun, R Lai, and KY Zhang. 2009. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59(7): 1603–1608. DOI: 10.1099/ijs.0.65718-0.
- Zhong, B, C Lv, W Li, C Li, and T Chen. 2023. Virulence of entomopathogenic bacteria *Serratia marcescens* against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). PeerJ. 11: e16528. DOI: 10.7717/peerj.16528
- Zhu, KY, H Merzendorfer, W Zhang, J Zhang, and S Muthukrishnan. 2016. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. Annual Review of Entomology. 61(1): 177–196. DOI: 10.1146/annurev-ento-010715-023933.
- Zivkovic Zaric, R, M Zaric, M Sekulic, N Zornic, J Nesic, V Rosic, T Vulovic, M Spasic, M Vuleta, J Jovanovic, D Jovanovic, S Jakovljevic, and P Canovic. 2023. Antimicrobial treatment of *Serratia marcescens* invasive infections: Systematic review. Antibiotics (Basel, Switzerland). 12(2): 367. DOI: 10.3390/antibiotics12020367.