

KARAKTERISASI GENETIK ISOLAT *Bacillus thuringiensis* BERDASARKAN GEN PENANDA 16S rRNA

Mega Tyas Prihatin*, Vector Stephen Dewangga

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional

Jl.Solo Baki Kwarasan Sukoharjo, Indonesia

*Corresponding author , email : vector.stephen@stikesnas.ac.id

Abstract

Background: *Bacillus thuringiensis* is a rod-shaped bacterium, non-encapsulated, gram-positive, motile with peritrichous flagella, and forms spores. This bacterium is a group of bacteria in the *Cereus* group. More than 82 *Bt* serovars were identified by flagellar antigen analysis (serotyping), however this test could not determine the relationship between variants. **Aims:** The purpose of this study was to determine the genetic diversity and relation between *B. thuringiensis* isolates based on the 16s rRNA gene, and to determine the pattern of diversity and relation of *B.thuringiensis* and other bacteria in the *Cereus* bacterial group. **Methods:** After End point PCR test with general 16s rRNA primer and sequencing by sanger sequencing, the DNA sequences were analyzed using MEGA X software. Alignment with references in the genbank was performed using Cluster W statistics and then the genetic distance was calculated. **Results:** From the calculation of genetic distance, Salatiga isolates were divided into 3 large groups with genetic distance between isolates 0. 1st Group are Salatiga isolate 2,8,11,12,13,17 and 19. 2nd group are Salatiga isolate 6 and 7, lastly Salatiga isolate 9. Groups 1 and 2 have a genetic distance of 0.55%, groups 1 and 3 are 0.68 percent, groups 2 and 3 are 0.14%. From the calculation of the genetic distance, then constructed into a phylogenetic tree. From the construction of the phylogeny tree, salatiga isolates were divided into two clusters. Cluster 1, salatiga isolates 2,8,11,12,13,17 and 19 were close to *B.thuringiensis* serovar *israelensis*. Meanwhile, cluster 2 isolates 6,7 and 9 were close to *B.thuringiensis* serovar *kurstaki*. **Conclusion:** From the results of the analysis of secondary data on bacteria from the *Cereus* group in the genbank and the construction of the phylogenetic tree. 16s rRNA gene alone is not sufficient to differentiate and classify the bacterial group *Cereus*.

Keyword: Genetic Characterization ,*Bacillus thuringiensis*, 16s rRNA

1. Pendahuluan

Grup Bakteri *Bacillus cereus* terdiri dari berbagai macam spesies bakteri. Bakteri dalam grup ini sangat menarik untuk di teliti, dikarenakan bakteri ini memiliki fungsi penting di dunia industri dan kesehatan. Akan tetapi, bakteri ini sangat susah untuk di bedakan level spesies nya (16). Lebih dari 82 serovar *Bt* diidentifikasi dengan analisis antigen flagellar (serotyping). Namun, klasifikasi ini memiliki keterbatasan dalam mendefinisasi kekerabatan spesies ini. Beberapa Strain *Bti* dari serovar yang

berbeda memiliki persamaan uji. Uji serotyping tidak dapat digunakan untuk menguji strain *non motile*, dan strain yang memiliki kemampuan *self flagellar*. Selain itu, aglutinasi juga ditemukan pada *B.cereus* dengan strain H antigen. Analisis perbedaan genetik pada bakteri *Bacillus thuringiensis* diharapkan dapat memberikan gambaran perbedaan yang lebih jelas antar varian pada spesies *Bacillus thuringiensis* (16-17). Gene 16s rRNA adalah bagian dari gen ribosomal yang memiliki sifat lestari sehingga gen ini

merupakan gen yang paling sering digunakan untuk menentukan kekerabatan dan klasifikasi suatu spesies bakteri. Gen 16s rRNA ini dapat membedakan spesies bakteri yang tidak dapat dibedakan secara biokimia. Analisis taxonomi dengan menggunakan 16sRNA dipilih dikarenakan bagian gen ini yang paling *conserved* dengan *homology* 99,7-100%. (16) Dalam penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim pada tahun 2010, dari 20 strain bakteri *Bacillus thuringiensis* yang dianalisis dengan bootstrapped neighbor-joining terpisah menjadi dua klaster. Klaster 1 *B.thuringiensis* yang memiliki persamaan genetik dengan *Bt serovar konkukian* dan *Bt Al-Hakm* serta bakteri *Cereus* grup lain yang patogen. Klaster 2 memiliki persamaan genetik dengan *Bt serovar tenebrionis, morisoni, kurstaku, sotto, israelinsis dan berliner* yang non patogen dan memiliki sifat sebagai pengendali vektor. Di laboratorium Bakteriologi B2P2VRP Salatiga, masih terdapat isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* dengan beberapa sifat patogenitas terhadap jentik nyamuk yang berbeda. Isolat bakteri ini belum di temukan variannya berdasar uji konvensional. Untuk itu, diperlukan karakterisasi genetis berupa keragaman dan kekerabatannya untuk mengetahui kedudukan taksonominya lebih lanjut. Perbedaan klaster dengan target gen 16s rRNA dapat digunakan sebagai dasar

pengelompokan bakteri *B.thuringiensis* yang di laboratorium B2P2VRP Salatiga. Selain itu, karakterisasi genetik dapat digunakan sebagai acuan kemungkinan perbedaan patogenitas terhadap larva.

2. Metode

Desain penelitian pada penelitian ini adalah Deskriptif Observasional dengan membandingkan gen 16s rRNA antara satu isolat *B.thuringiensis* dengan isolat yang lain dan kemudian di lakukan perbandingan karakterisasi molekuler dan kedekatan kekerabatannya dengan menggunakan pohon filogeni. Sampel penelitian ini adalah isolat bakteri *thuringiensis* yang sudah diketahui daya bunuhnya terhadap larva *Aedes, Anopheles* dan *Culex*. Dengan data yang diambil merupakan data primer berupa hasil sequencing DNA dari bakteri *B.thuringiensis* isolat Salatiga dan database bakteri *B.thuringiensis* dan *B.cereus* group di genebank. Alat dan bahan yang digunakan adalah Isolat Bakteri *Bacillus thuringiensis*, Kit ekstraksi DNA, Taq polimerase mix per kit, Agarose, TAE buffer, enzim *exosap*, bigdye sequencing kit, bigdye X terminator, POP 7, *cathode buffer, Anoda buffer*, Nuclease free water dan Primer 16s rRNA. tube 1,5ml, *Sentrifuge*, mikropipet 10-1000ul, *Thermalcycler, spindown*, Elektroforesis set, Geldoc, Mesin sanger sequencing Applied Biosystem (ABI) 3500xl. Isolat Bti dari

laboratorium bakteriologi di ekstraksi DNA nya dengan kit ekstraksi DNA Dnaesay dari Qiagen dengan protokol sesuai dengan *handbook* reagen [7]. sebanyak 12,5 µl master mix promega, primer *forward* 27f (GTT TGA TCM TGG CTC AG) dan *reverse* 1492 (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) konsentrasi 10 nm masing-masing 1 µl, isolat DNA sebanyak 5 µl, dan NFW 5,5 µl sehingga total reaksi menjadi 25 µl. Selanjutnya, *microtube* dimasukkan dalam *Thermocycler* dan program tahapan PCR dengan protokol predenaturasi 95° C selama 2 menit. Dilanjutkan 35x 95° C 30 detik, 62° C 30 detik, 72° C 30 detik. Kemudian 1x ekstra ekstensi 72° C selama 5 menit (Punina et al. 2013). Sampel kemudian di lakukan elektroforesis dengan agarose 2% voltase 90V selama 1 jam. Target DNA untuk primer general 16s rRNA adalah 1500bp [6,13,16]. Isolat bakteri yang ditemukan band dalam proses elektroforesis kemudian dilakukan purifikasi dengan enzim Exosap. Sebanyak 5ul produk PCR diambil dan ditambahkan enzim exosap sebanyak 2µl. Setelah itu, diinkubasi di mesin thermocycler pada suhu 37° celcius 15 menit dilanjutkan 80°celcius selama 15 menit.

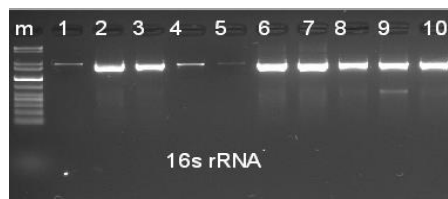
Hasil purifikasi produk PCR kemudian dilakukan kuantifikasi dengan

menggunakan nanodrop untuk diketahui konsentrasinya. Setelah itu dilakukan PCR cycle sequencing dengan menggunakan bigdye kit sequencing dari Applied biosystem. [1,2,15]. Produk PCR cycle sequencing kemudian dilakukan purifikasi dengan menggunakan Bigdye X terminator. Sampel kemudian diproses pada mesin sanger sequencing GA3500XL dari applied biosystem dengan protokol POP 7 Standar.[2,15]

Hasil data sequencing, kemudian di analisis dengan software sequencing analysis v5.2 (Applied biosystem) dan kemudian dilihat perbedaan homology dan keragamannya dengan menggunakan software Bioedit dan MEGA X. Selain data sequence dari 10 Isolat sampel Salatiga, juga akan dibandingkan dengan bakteri dari grup *Bacillus cereus* lain yang berada di genebank. Pembuatan pohon filogeni menggunakan software MEGA X dengan metode maximum likelihood (ML) dan kimura-2. [14]

3. Hasil

Dari Penelitian yang dilakukan di dapatkan hasil band target PCR dengan menggunakan primer 16s rRNA. Visualisasi hasil PCR menggunakan agarose konsentrasi 2% dan di elektroforesis dengan TAE 1x pada voltase 90 *volt* selama 1 jam. didapatkan hasil band elektroforesis sebesar 1500bp



Ket : 1: Salatiga 2, 2: Salatiga 6, 3: Salatiga 7, 4: Salatiga 8, 5:Salatiga 9, 6: Salatiga 11, 7: Salatiga 12, 8: Salatiga 13, 9: Salatiga 17, 10: Salatiga 19. Penamaan sampel berdasarkan penamaan isolat di B2P2VRP

Gambar 1. Foto Hasil Elektroforosis gen 16s rRNA

Hasil sequencing di aligment dengan software mega X kemudian dianalisis jarak genetisnya dengan parameter pairwise distance. Selain antar isolat dari laboratorium salatiga, jarak genetik dibandingkan juga dengan beberapa data *B.thuringiensis* dan grup Bakteri *Cereus* yang ada di genebank. jarak genetik isolat *B.thuringiensis* dari laboratorium salatiga berdasarkan gen 16s rRNA, dibagi menjadi tiga kelompok besar. Kelompok pertama, adalah isolat dengan kode Salatiga 12, Salatiga 17, Salatiga,19, Salatiga 2, Salatiga 8, Salatiga 11 dan Salatiga 13. Kelompok 2, adalah isolat dengan kode Salatiga 6 dan Salatiga 7. Kelompok 3 adalah isolat dengan kode Salatiga 9. Antara kelompok 1 dan Kelompok 2, memiliki jarak genetik

sebesar 0,55 persen. Kelompok 1 dan Kelompok 3 memiliki jarak genetik sebesar 0,68 persen. Sedangkan, kelompok 2 dan 3 memiliki jarak genetik sebesar 0,14 persen.Selain *B.thuringiensis* pohon filogeni juga dibandingkan dengan bakteri dalam kelompok grup bakteri *Cereus* Seperti *B.antrachis*, *B.mycoides* dan *B.cytotoxicus*. Dari hasil analisis didapatkan hasil bahwa 16s rRNA tidak dapat membedakan dengan jelas antar bakteri di grup *Cereus*. Terlihat dari hasil perbedaan genetik beberapa bakteri dalam grup *Cereus* memiliki jarak genetik sebesar 0% atau Persamaan genetik 100 persen. Beberapa bakteri dalam grup cereus memiliki perbedaan jarak genetik, namun perbedaan tersebut hanya terjadi secara acak dan tidak spesifik.

Tabel 1. Jarak genetik antar *B.cereus* grup

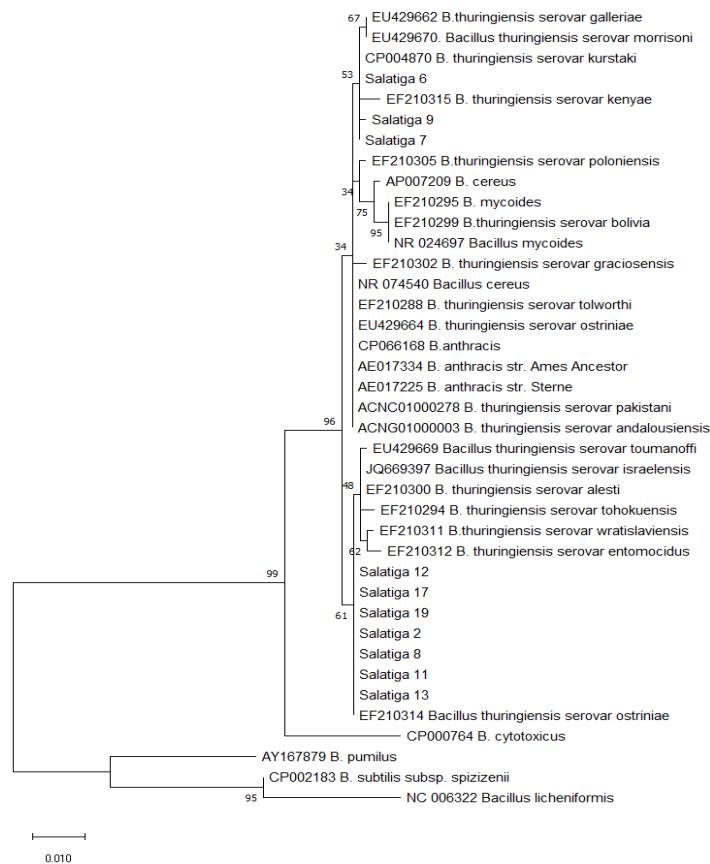
	<i>Bti.ser. pakistani</i>	<i>Bti. Ser. Andalousiensis</i>	<i>B. anthracis str. Ames Ancestor</i>	<i>B.cereus</i>	<i>B.pumilus</i>
1	3,12	3,12	3,12	3,43	8,7
2	0,14	0,14	0,14	0,41	8,91
3	0	0	0	0,55	8,73
4	0	0	0	0,55	8,73
5	0,82	0,82	0,82	1,1	8,93
6	0,69	0,69	0,69	0,41	8,91
7	0,69	0,69	0,69	0,41	8,91
8	0,55	0,55	0,55	0,82	8,56
9	0,41	0,41	0,41	0,96	8,38
10	0,55	0,55	0,55	0,82	9,46
11	0,27	0,27	0,27	0,55	9,08
12	0	0	0	0,55	8,73
13	0,68	0,68	0,68	0,96	8,73
14	0,27	0,27	0,27	0,55	9,08
15	0,55	0,55	0,55	0,82	8,56
16	0	0	0	0,55	8,73

Keterangan : 1. *B. Cytotoxicus*, 2. *Bti. serovar kurstaki*, 3. *B.anthraxis*, 4. *Bti. serovar tolworthi*, 5. *B.thuringiensis serovar tohokuensis*, 6. *B.mycoides*, 7. *Bti. serovar bolivia*, 8. *Bti.Serovar alesti* 9. *Bti.serovar ostrinia*, 10. *Bti.serovar kenya*, 11. *Bti. Serovar galleriae*, 12. *Bti.serovar ostrinia*, 13. *Bti.serovar toumanoffi*, 14. *Bti.serovar morrisoni*, 15. *Bti.serovar israelensis*, 16. *B.cereus*

Analisis pohon filogeni mengambil data primer dari sampel isolat Salatiga serta beberapa Serovar *B.thuringiensis* dan *B.cereus* dari databased *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA). Outlayer data sebagai anchestor adalah *B.pumilus*, *B.subtilis subsp.spizizenii* dan *B.lichenformis*.

Data nucleotida kemudian dilakukan *alignment* dan di lakukan kontruksi untuk

membuat pohon filogeni dengan menggunakan software mega X dengan metode statistik *maximum likelihood* dan Kimura 2 model menggunakan nilai bootstrap 1000, serta rate distribusinya *Gamma distributed with invarian site*. [10,12,14,4]



Gambar 2. Pohon filogeni *B.thuringiensis* isolat Salatiga

Hasil dendrogram filogeni dari isolate *B.thuringiensis* B2P2VRP Salatiga mengelompok menjadi 2 klaster. Klaster pertama yaitu isolat dengan kode Salatiga 6, Salatiga 7 dan Salatiga 9, ketiga isolat tersebut dekat dengan *B.thuringiensis* serovar *kurstaki*, *B.thuringiensis* serovar *kenyae* *B.thuringiensis* serovar *morrisoni* dan *B.thuringiensis* serovar *galleriae*. Klaster kedua isolat dengan kode Salatiga 2, Salatiga 8, Salatiga 11, Salatiga 12, Salatiga 13, Salatiga 17 dan Salatiga 19 memiliki kedekatan dengan *B.thuringiensis* Serovar *ostrinae*, *B.thuringiensis* Serovar *toumenoffi*,

B.thuringiensis Serovar *israelensis*, *B.thuringiensis* Serovar *alesti* *B.thuringiensis* Serovar *tohokuensis* *B.thuringiensis* Serovar *wratislaveinses*, *B.thuringiensis* Serovar *entomocidus*.

4. Pembahasan

Isolat *B.thuringiensis* di laboratorium B2P2VRP Salatiga dapat dikelompokkan menjadi tiga strain berdasarkan jarak genetisnya. Strain pertama, adalah isolat dengan kode Salatiga 2, Salatiga 8, Salatiga 11, Salatiga 12, Salatiga 13. Salatiga 17 dan Salatiga 19. Strain kedua adalah isolat dengan kode Salatiga 6 dan

Salatiga 7. Strain ketiga adalah isolat dengan kode Salatiga 9. Strain adalah varian genetik atau subtipe dari suatu organisme.[14]

Perbedaan jarak genetik dan juga perbedaan kluster diatas memungkinkan adanya perbedaan toksistas terhadap larva nyamuk pada isolat *B.thuringiensis* B2P2VRP Salatiga. Semakin dekat jarak genetik, maka sifat dari isolat semakin sama, begitupun sebaliknya. Perbedaan genetik antar isolat dimungkinkan juga karena lokasi penemuan isolat yang berbeda. Pengelompokan isolat B2P2VRP Salatiga awalnya berdasar uji serologis yang sudah dilakukan pada tahun 1998 [3]. Strain dan serovar dalam pengelompokan bakteri merupakan dua hal yang berbeda walaupun keduanya merupakan pengelompokan dibawah level spesies. Serovar adalah pengelompokan bakteri berdasarkan serologisnya. Sedangkan strain adalah pengelompokan bakteri berdasarkan varian genetik atau subtipenya. Bakteri yang memiliki serovar yang sama belum tentu berbagi genetik yang sama. Hal ini sesuai dengan Pengelompokan *B.thuringiensis* berdasarkan gen 16s rRNA pada penelitian Joung *et al* (2001), pengelompokan ini menggunakan dasar serovar dan membaginya menjadi empat kluster. Yang dapat disimpulkan bahwa uji serovar dalam sub antigen seharusnya tidak menimbulkan adanya perbedaan

DNA yang sangat tinggi. Namun, saat dilakukan karakterisasi menggunakan 16s rRNA mereka akan membentuk kelompok tersendiri[10,18].Brahim soufiane juga melakukan konstruksi filogeni dengan gen 16s rRNA berdasarkan serovar *B.thuringiensis* H serotype. Hasilnya, 16s rRNA dapat digunakan untuk membedakan strain H serotype berdasarkan serovarnya dan memisahkan kekerabatan H serotype menjadi 2 kluster [18]. Seperti terlihat pada filogeni yang di konstruksi pada penelitian ini, walaupun serovar dari isolat B2P2VRP Salatiga tidak dapat diketahui hanya dengan 16s rRNA, kita dapat mengetahui bahwa isolat tersebut mengelompok menjadi dua kluster. Sehingga, dapat menjadi digunakan sebagai dasar awal dari sifat isolat tersebut. Dari hasil filogeni, isolat dari B2P2VRP Salatiga sangat dekat dengan dua strain yang sering digunakan sebagai pengendali larva dan dikomersilkan di dunia yaitu strain Israelensis dan strain kurstaki. Hal ini karena strain Israelensis dan kurstaki karena memiliki range daya bunuh yang lebih luas dan mudah di temukan di berbagai tipe ekologis. Selain itu, masing-masing strain ini memiliki kemampuan daya bunuh pada jenis larva yang berbeda [5].

Dari hasil analisis didapatkan hasil bahwa 16s rRNA tidak dapat membedakan dengan jelas antar bakteri di grup *Cereus*. Terlihat dari hasil perbedaan

genetis beberapa bakteri dalam grup *Cereus* memiliki jarak genetis sebesar 0% atau Persamaan genetis 100 persen. Studi penggunaan penggunaan gen 16s rRNA secara taksonomi sering digunakan untuk identifikasi genus bakteri *Bacillus*, namun penggunaan gen ini saja tidak cukup untuk membedakan spesies bakteri di grup *Cereus*. Hal ini disebabkan karena gen ini sangat *conserved* sebesar 97-100 persen sehingga perbedaan genetis yang sangat kecil tidak terbaca di gen ini saja. Penggunaan gen 16s rRNA untuk pembedaan bakteri pada grup *Cereus* menghasilkan *B.antrachis* yang terpisah dengan *B.cereus* lainnya. Akan tetapi, derajat kepercayaannya rendah. *B.cereus* di golongkan menjadi 2 klaster yaitu klaster 1 dan klaster. Namun, hampir semua perbedaan nukleotida yang ada terjadi secara acak dan strain spesifik. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa gen 16s rRNA tidak cukup untuk mengakomodir kekerabatan antar bakteri dalam grup *Cereus* dibawah level genus atau spesies yang mana disebabkan tidak adanya nucleotida spesifik pada gen ini [16]. Helgason *et al* (2000) mengkategorikan bahwa *B.antrachis*, *B.cereus* dan *B.thuringiensis* adalah satu spesies berdasarkan penanda genetis nya. Namun, karakterisasi lain seperti adanya aktifitas antibiotik beta laktan dan ketiadaan aktifitas motil dan hemolitik tetap membuktikan bahwa bakteri tersebut

merupakan spesies yang berbeda. apalagi untuk *B.thuringiensis*, hanya bakteri ini yang memiliki aktifitas endotoxin pada serangga dan tidak pada bakteri lainnya. Sehingga, disimpulkan perbedaan genetis pasti tetap ada walau hanya satu gen dan tidak cukup di uji dengan 16s rRNA saja [8]. Berdasarkan data sebelumnya, Helgason (2004) kembali melakukan penelitian untuk menemukan karakterisasi dari bakteri grup *Cereus*, Ia melakukan karakterisasi bakteri grup ini dengan menggunakan *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) dimana pada karakterisasi ini digunakan 5 housekeeping gene yang dimiliki oleh bakteri grup *Cereus*. Hasilnya, bakteri dalam grup *Cereus* terpisah secara nyata. Liu pada tahun 2015 juga menambahkan bahwa uji dengan MLST dibandingkan dengan hanya menggunakan 16s rRNA lebih menggambarkan variasi genetis pada grup bakteri *Cereus*. Selain itu, saat ini penggunaan *whole genome sequencing* juga telah berhasil memisahkan bakteri dalam grup bakteri *Cereus* dengan jelas. Walaupun, bakteri-bakteri tersebut masih memiliki kesamaan genetis yang sangat tinggi [9,12].

5. Kesimpulan

Ada keragaman genetik antar isolat yang diisolasi di laboratorium B2P2VRP Salatiga. Keragaman genetik yang di nyatakan dalam persen tersebut

mengelompokan isolat bakteri *B.thuringiensis* Salatiga menjadi 3 kelompok. Dari sepuluh isolat bakteri yang diisolasi oleh laboratorium B2P2VRP Salatiga, mengelompok menjadi dua kategori yang saat dibandingkan dengan referensi di *genebank* mereka terbagi jelas menjadi dua klaster. Setelah dilakukan analisis dengan menggunakan gen 16s rRNA yang berasal dari *genebank*, penggunaan gen 16s rRNA saja tidak cukup untuk mendefinisasi bakteri dalam grup *Cereus*.

Perlu dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan kristal protein pada isolat bakteri *B.thuringiensis* B2P2VRP Salatiga, untuk mengetahui isolat mana yang paling banyak memiliki kristal protein dan memiliki daya bunuh terhadap larva paling tinggi. Selain itu dapat dilakukan uji MLST dengan menggunakan beberapa pembanding dari bakteri grup *Cereus* untuk mengetahui keragaman genetik grup bakteri *Cereus* lebih luas.

Daftar Pustaka

1. Asokan, R., H. M.Mahadeva Swamy, and D. K. Arora. 2012. "Screening, Diversity and Partial Sequence Comparison of Vegetative Insecticidal Protein (Vip3A) Genes in the Local Isolates of *Bacillus Thuringiensis* Berliner." *Current Microbiology* 64(4): 365–70.
2. Biosystems, A. (2015). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Applied Biosystems *Meditory* | ISSN Online : 2549-1520, ISSN Cetak : 2338 – 1159, Vol. 11, No. 1, Juni 2023 Hlm. 97 – 106, <http://ejournal.poltekkes-denpasar.ac.id/index.php/M>
3. Blondine, C. (1998). uji serologi isolat *Bacillus thuringiensis* dan patogenisitasnya terhadap jentik.*Buletin Penelitian Kesehatan*, 26 (2&3), 91-98
4. De Respinis, S. et al. 2006. "Molecular Identification of *Bacillus Thuringiensis* Var. *Israelensis* to Trace Its Fate after Application as a Biological Insecticide in Wetland Ecosystems." *Letters in Applied Microbiology* 43(5): 495–501.
5. Empey, M. A., Lefebvre-Raine, M., Gutierrez-Villagomez, J. M., Langlois, V. S., & Trudeau, V. L. (2021). A Review of the Effects of the Biopesticides *Bacillus thuringiensis* Serotypes *israelensis* (Bti) and *kurstaki* (Btk) in Amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), 789–800. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00842-2>
6. Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A., & Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. *Springer Nature Ebook*, 1–288. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8>
7. QIAGEN (2020) "DNeasy Blood & Tissue Handbook." *Qiagen*
8. Helgason, E., Økstad, O. L. E. A., Caugant, D. A., Mock, L. E., Hegna, I. D. A., Johansen, H. A., & Fouet, A. (2000). One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2627–2630.
9. Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A., & Kolstø, A. (2004). Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 191–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191>
10. Joung, K. B., & Côté, J. C. (2001). *Chemistry Guide | Third Edition. Thermo Scientific Press.*

- Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Applied Microbiology*, 90(1), 115–122.
11. Lestari, D. A., Azrianingsih, R., & Hendrian, H. (2018). Filogenetik Jenis-jenis Annonaceae dari Jawa Timur Koleksi Kebun Raya Purwodadi Berdasarkan Coding dan Non-coding sekuen DNA. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.22146/jtbb.28308>
 12. Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y. Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
 13. Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), 1–15. <https://doi.org/10.3791/3998>
 14. Nei, M., & Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press*.
 15. Podnar, J. W., Pantano, L., Zeller, M. J., Kolling, F. W., Zhang, Y., Alekseyev, Y. O., Adams, M. (2020). Cross-Site Evaluation of Commercial Sanger Sequencing Chemistries, *J. Biomol Tech.* 31(3).88–93. <https://doi.org/10.7171/jbt.20-3103-002>
 16. Punina, N. V., Zotov, V. S., Parkhomenko, A. L., Parkhomenko, T. U., & Topunov, A. F. (2013). Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and gyrB Genes and by AP-PCR and saAFLP. *Acta Naturae*, 5(16), 90–100. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-1-90-100>
 17. Reyes-ramirez, A., & Ibarra, J. E. (2005). Fingerprinting of *B.thuringiensis* Type strain and Isolate Using *Bacillus cereus* Group-Specific Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Analysis. *Applied and environmental Microbiology*, 71(3), 1346–1355. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1346-1355.2005>
 18. Soufiane, B., & Côté, J. C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, gyrB and aroE gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 95(1), 33–45. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9285-4>
 19. Staton, L.J. (2015) Understanding phylogenies: Constructing and interpreting phylogenetic trees, *Journal of the South Carolina Academy of Science*. 13(1), 24-29.