

## ULAS BALIK

### Pembentukan Inti Es oleh Bakteri (Formation of Bacterial Ice Nuclei)

ARIS TRI WAHYUDI

Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 25 Oktober 1995 / Disetujui 29 November 1995

Several bacterial species are able to catalyze ice formation at temperatures as warm as -2°C. These bacteria which are generally inhabiting plant surfaces, catalyze ice formation at temperatures much higher than most organic or inorganic substances. In some cases, they are responsible for frost injury on certain plants. The ability of these bacteria to nucleate ice make them useful in ice nucleation-associated applications, such as the freezing of some food products, artificial snow production, and possibly in future weather modification scheme. Every ice-nucleating bacteria known to date has *ice*<sup>+</sup> gene, encoding ice nucleation protein. These proteins have been shown to be located in the outer membrane and require lipid or carbohydrate for their functional activities. Some physical and biochemical factors such as growth temperature, culture age, medium, pH, metal ions and cationic detergent can influence expression of ice nucleation. Recently, *ice*<sup>+</sup> gene has been used for a new reporter gene system for monitoring bacterial activity in their natural habitats.

#### PENDAHULUAN

Kemampuan spesies bakteri tertentu untuk mengkatalisis pembentukan es merupakan suatu fenotipe yang menarik, baik secara praktis maupun aplikasi ilmiahnya. Suatu fenomena pembentukan inti es pada bakteri yang terutama banyak diamati ialah pada *Pseudomonas syringae*. Disamping itu bakteri spesies lain seperti *Erwinia herbicola*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, dan *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* dapat juga membentuk inti es dari air yang lewat dingin (Lindow, 1983; Lindow, 1990). Semua spesies bakteri tersebut umumnya mampu mengkatalisis pembentukan es pada suhu di atas -10 °C. Beberapa spesies di antaranya bahkan dapat membentuk inti es pada suhu -1.5 °C. Bakteri tersebut secara alami aktif karena adanya substansi pembentuk inti es (Lindow, 1983). Spesies-spesies bakteri tersebut umumnya bersifat epifit pada tanaman, dan kehadirannya pada permukaan tanaman dapat meningkatkan kemungkinan tanaman mengalami terjadinya luka beku pada suhu di atas -5 °C (Lindow *et al.*, 1982a). Walaupun aktivitas pembentukan inti es pada bakteri jelas terbatas pada spesies bakteri gram negatif, kehadiran spesies-spesies ini pada tanaman dan habitat alami yang lain membuat pembentukan inti es pada bakteri di alam merupakan suatu fenomena umum yang menarik (Gurian-Sherman dan Lindow, 1993). Lindow *et al.* (1978) meneliti distribusi dari bakteri yang aktif membentuk inti es pada tanaman di alam. Ternyata semua bakteri pembentuk inti es yang mereka isolasi mewakili spesies *P. syringae* atau *E. herbicola*. Hal ini menunjukkan bahwa kehadiran kedua spesies bakteri ini di alam lebih banyak dibandingkan dengan bakteri pembentuk inti es spesies lain.

Dari kedua spesies tersebut, *P. syringae* ialah yang banyak ditelaah peneliti dibandingkan spesies lainnya.

Suatu sifat yang menarik dari bakteri pembentuk inti es secara kuantitatif dan kualitatif bervariasi. Dalam hal ini protein tunggal bertanggung jawab atau berperan dalam pembentukan inti es. Suatu populasi sel dari galur-galur bakteri yang aktif membentuk inti es, bagaimanapun mengandung inti es yang aktif sebagai katalis untuk membentuk es dalam air lewat dingin yang suhunya antara -2 hingga -12 °C, meskipun tidak setiap sel bakteri mengandung inti es. Pada suhu hangat (-5-0 °C) inti es cenderung menjadi jarang dalam suatu populasi sel. Sebagai contoh misalnya, biasanya kurang dari 10<sup>-4</sup> dari semua sel dalam biakan mengandung inti es yang aktif pada suhu lebih hangat dari -2 °C (Govindarajan dan Lindow, 1988). Inti es aktif pada suhu yang lebih dingin biasanya lebih banyak daripada yang aktif pada suhu yang lebih hangat (Govindarajan dan Lindow, 1988; Lindow, 1990).

Mengingat peran dari bakteri pembentuk inti es tersebut, pemanfaatan bakteri ini secara praktis maupun aplikasi ilmiahnya mempunyai arti yang penting. Disamping itu, pemahaman mengenai protein yang berperan dalam pembentukan inti es dan faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan inti es juga perlu dipahami.

#### APLIKASI ILMIAH

: Aktivitas pembentukan inti es telah dikembangkan dan digunakan sebagai dasar dalam sistem gen pelapor baru, untuk itu gen pembentuk inti es digabungkan dengan promotor atau elemen pengatur dari gen yang ingin dimonitor ekspresinya.

Aktivitas pembentukan inti es dapat diukur dengan baik melalui asai tetes beku (*droplet freezing assay*). Banyak gen dapat digunakan sebagai pelapor, di antaranya ialah *lacZ* dari *E. coli*, *galK* dari *E. coli*, *phaA* dari *E. coli*, *luxAB* dari *Vibrio harveyi*, *xylE* dari plasmid TOL dari *Pseudomonas*, *cat-86* dari *Bacillus pumilis*, *ampC* dari *E. coli*, *neo* dari Tn5 (Chater dan Hopwood, 1989) dan yang baru ialah gen aktif pembentuk inti es (*ice nucleation active* = *ina*<sup>+</sup> atau *ice*<sup>+</sup>) dari *P. syringae*. Khusus yang terakhir ini telah banyak digunakan untuk telaah ekologi dari berbagai spesies bakteri (Lindgren *et al.*, 1989).

Suatu metode yang andal untuk mengetahui atau memperkirakan aktivitas gen yang produknya tidak diketahui atau sulit diukur ialah dengan menempatkan aktivitas transkripsinya pada gen pelapor. Dalam hal ini produknya dapat diukur dengan mudah melalui kontrol pengaturan gen yang ditelaah. Gen *lacZ* dan *cat* telah digunakan sebagai gen pelapor dalam kultur karena produknya dapat dengan mudah diukur dan ditentukan kuantitasnya dalam kondisi terkontrol. Meskipun demikian, beberapa gen pelapor seperti  $\beta$ -galaktosidase yang disandikan oleh *lacZ*, seringkali tidak dapat dengan cepat ditentukan kuantitasnya di habitat alami bakteri pembawa gen tersebut. Gen pelapor lain seperti *gus* dan *lux* dalam aplikasinya mempunyai beberapa batasan. Emisi dari cahaya yang dihasilkan oleh lusiferase, yang merupakan produk gen *lux*, bergantung pada aktivitas metabolik yang tinggi dalam sel bakteri yang akan diukur aktivitas gennya. Selain itu, sejumlah besar sel yang mengandung fusi gen *lux* atau *gus* diperlukan untuk mendeteksi aktivitas gen pada tingkat transkripsi yang rendah (Lindow, 1991).

Pengembangan suatu sistem gen pelapor baru yang didasarkan pada aktivitas pembentukan inti es merupakan sesuatu yang penting. Sebuah gen *inaZ* tanpa promotor dari *P. syringae* telah dibuktikan sebagai gen pelapor yang serba guna dan sistem ini mempunyai kepekaan yang tinggi. Ekspresi dari aktivitas pembentukan inti es dalam sel bakteri tunggal yang mengandung fusi gen *inaZ* dapat dengan mudah diukur karena aktivitas transkripsinya berada pada tingkat yang tinggi. Bahkan hasil transkripsi gen tersebut dapat dideteksi dalam jumlah  $10^3$  sel. Aktivitas pembentukan inti es yang diperoleh ternyata  $10^5$  kali lebih peka jika dibandingkan dengan galaktosidase yang diukur pada taraf transkripsinya. Aktivitas pembentukan inti es dapat digunakan sebagai gen pelapor yang serba guna karena sebagian besar spesies bakteri gram negatif mampu mengekspresikannya dengan efisien (Lindgren *et al.*, 1989).

Sistem gen pelapor pembentuk inti es aktif, mempunyai kepekaan yang tinggi dan kurang dipengaruhi oleh komponen-komponen dari lingkungan dibandingkan dengan gen pelapor yang lain. Sistem gen pelapor tersebut dapat menyediakan kesempatan untuk mengukur aktivitas gen yang menarik perhatian di habitat alami bakteri pembawa gen tersebut (Lindgren *et al.*, 1989). Sistem ini bahkan dapat digunakan untuk memaparkan gen-gen yang terlibat dalam patogenesitas tanaman maupun interaksi lain antara bakteri dengan tanaman. Selain dapat diekspresikan pada berbagai jenis bakteri gram negatif, gen *inaZ* juga dapat diekspresikan pada tanaman (Baertlein *et al.*, 1992).

Semua sistem gen pelapor yang digunakan sekarang ini melibatkan gen-gen yang menyandikan suatu protein yang aktif secara enzimatik. Kepekaan sistem ini berubah menurut

sifat-sifat dari enzim pelapor, kondisi lingkungan dan kualitas dari uji yang digunakan, serta ada tidaknya pengaruh aktivitas dalam tipe sel atau jaringan. Kepekaan menjadi betul-betul penting jika gen yang diekspresikan berada pada tingkat yang sangat rendah atau jika aktivitas gen harus diukur di dalam contoh yang mengandung sejumlah kecil sel (Lindgren *et al.*, 1989). Namun, pada sistem gen pelapor pembentuk inti es, protein yang aktif membentuk inti es (yang merupakan produk dari aktivitas gen *ice*<sup>+</sup>) bukanlah suatu enzim. Protein Ice hanya berperan sebagai katalisator hayati untuk pembentukan es dari air yang lewat dingin.

Sehubungan dengan penggunaan gen pelapor bakteri pembentuk inti es akhir-akhir ini telah ditelaah yang melibatkan interaksi antara bakteri dengan tanaman. Secara alami bakteri yang digunakan tidak dapat membentuk inti es, yaitu *P. syringae* pv. *phaseolicola*, *Agrobacterium tumefaciens* dan *Rhizobium meliloti*. Gen *IceC* dari *P. syringae* Cit7 yang dibawa oleh plasmid berspektrum inang luas pICE1 ditransfer ke *A. tumefaciens* C58, *R. meliloti* RM1021 dan *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121. Semua spesies ini ternyata mampu membentuk inti es, akan tetapi secara kualitatif dan kuantitatif ekspresi pembentukan inti es berbeda dari inangnya. Ekspresi pembentukan inti es pada *A. tumefaciens* dan *R. meliloti* kurang efisien bila dibandingkan dengan *P. syringae* Cit7 atau *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Batas suhu tertinggi yang masih memungkinkan pembentukan inti es untuk *A. tumefaciens* C58 (pICE1) dan *R. meliloti* RM1021 (pICE1) berturut-turut ialah -3 °C dan -3.5 °C. Sedangkan untuk *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (pICE1) dan *P. syringae* Cit7 ialah antara -1.5 °C hingga -1 °C (Lindgren *et al.*, 1989).

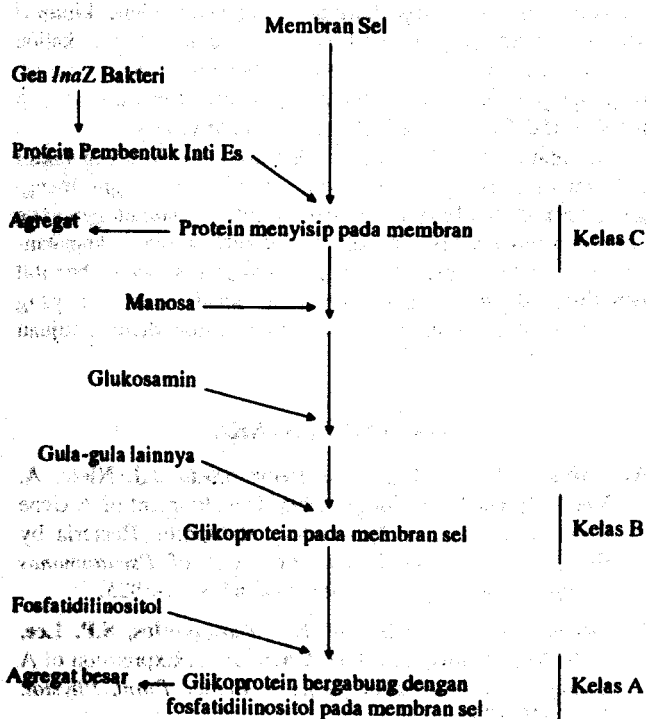
Penggunaan sistem gen pelapor ini juga telah digunakan untuk menerangkan ekspresi gen yang terlibat dalam sensor ketersediaan ion-ion besi pada tanaman dan di dalam tanah dengan menggunakan fusi pada promotor pengatur besi (Loper dan Lindow, 1994). Penggunaan sistem ini untuk analisis biosintesis phenazine pada *P. aureofaciens* PGS12 (Georgakopoulos *et al.*, 1994) dan analisis promotor (promotor untuk  $\beta$ -laktamase, promotor untuk piruvat dekarboksilase dan promotor untuk gen regulator dari *P. syringae* pv. *phaseolicola*) pada *Zymomonas mobilis* (Drainas *et al.*, 1995) juga telah diketahui, dan ternyata sistem ini mempunyai kepekaan yang tinggi. Kelompok bakteri yang agak halofil seperti *Deleya halophyla*, *Halomonas elongata*, *H. halodurans*, *H. miridiana*, *H. subglaciescola*, dan *Volcaniella eurihalina* (Arvanitis *et al.*, 1995) juga telah diketahui mampu mengekspresikan gen *ice*<sup>+</sup> atau *inaZ* dari *P. syringae*.

## PROTEIN PEMBENTUK INTI ES

Pembentukan inti es pada bakteri dibuat oleh gen tunggal dalam semua bakteri pembentuk inti es yang telah diuji, dan gen tersebut telah diklon dari hampir semua spesies bakteri tersebut. Walaupun gen pembentuk inti es panjangnya sedikit berbeda namun semua strukturnya serupa. Semua gen ini menyandikan protein yang unik atau khas pada ujung amino dan karboksilnya. Pada bagian ujung aminonya bermuatan listrik positif dan menyisip pada membran luar yang berperan untuk stabilitas. Pada ujung karboksilnya bermuatan positif maupun negatif. Sedangkan bagian tengah terdapat 16 asam amino yang diulang-ulang hingga 120 kali ulangan (80% hingga 90% dari total protein) dan kaya akan asam amino polar serin dan threonin

yang berperan dalam mengorientasikan molekul-molekul air tertata rapi hingga membentuk kristal es (Kozloff *et al.*, 1991b; Gurian-Sherman dan Lindow, 1993). Protein aktif pembentuk inti kristal es (INA) dari *P. syringae* terdapat pada membran luar sel dan untuk aktivitasnya diperlukan kesatuan dengan lipid membran (Kozloff *et al.*, 1991a) serta karbohidrat (Turner *et al.*, 1991). Kebanyakan protein ini bersifat hidrofilik, hal ini memungkinkannya terdapat pada permukaan membran luar bakteri (Kozloff *et al.*, 1991b). Dengan demikian protein INA tersebut akan menjadi aktif bila telah disisipkan pada membran luar sel bakteri. Disamping itu sejauh ini protein INA dilaporkan tidak mempunyai aktivitas enzimatis. Lipid yang turut berperan dalam pembentukan inti es ialah fosfatidilinositol (Kozloff *et al.*, 1991), sedangkan karbohidratnya dapat berupa manosa, kemungkinan kompleks manan dan mungkin glukosamin (Turner *et al.*, 1991).

Protein INA dilihat dari aktivitasnya terbagi atas tiga kelas utama yaitu kelas A, B, dan C. Kelas A aktif membentuk inti es pada suhu -2 hingga -5 °C, kelas B aktif pada suhu -5 hingga -7 °C, dan kelas C aktif pada suhu -7 hingga -10 °C (Rugless *et al.*, 1993). Pembagian ketiga kelas tersebut ternyata berhubungan dengan adanya lipid (fosfatidilinositol) maupun karbohidrat pada protein INA. Kelas A strukturnya mengandung protein pembentuk inti es yang bergabung dengan fosfatidilinositol dan manosa, mungkin sebagai kompleks manan serta glukosamin. Kelas B strukturnya mengandung protein pembentuk inti es yang bergabung dengan manan dan glukosamin, tapi tidak bergabung dengan fosfatidilinositol. Sedangkan kelas C, strukturnya mengandung protein pembentuk inti es yang bergabung dengan beberapa residu manosa saja (Turner *et al.*, 1991). Model sederhana dari pembentukan dan aktivitas protein pembentuk inti es terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pembentukan dan Aktivitas Protein Pembentuk Inti Es (Kozloff *et al.*, 1991b)

Ukuran protein INA berkisar antara 150 kilo Dalton (aktif membentuk inti es pada suhu -12 °C) hingga 190 000 kilo Dalton (aktif membentuk inti es pada suhu -2 °C), yang ditentukan melalui radiasi sinar gamma (Govindarajan dan Lindow, 1988). Fragmen DNA yang membawa gen *ice*<sup>+</sup> yang berperan menghasilkan protein aktif pembentuk inti es telah diklon dan dikarakterisasi memperlihatkan bahwa ukuran gen tersebut berkisar antara 3.5 sampai 4.0 kilo pasangan basa (kpb). Fragmen yang diklon ternyata mampu mengekspresikan protein pembentuk inti es dalam *E. coli*. Ekspresi pembentukan inti es pada *E. coli* secara kuantitatif dan kualitatif sebagian besar serupa atau mirip dengan protein yang dihasilkan oleh bakteri asalnya. Hal ini menyarankan bahwa produk gen *ice*<sup>+</sup> kemungkinan menentukan ekspresi dan aktivitas pembentukan inti es pada membran biologi (Orser *et al.*, 1985).

### APLIKASI GEN PEMBENTUK INTI ES

Bakteri pembentuk inti es telah diketahui dapat menyebabkan terjadinya luka beku pada beberapa spesies tanaman karena sebagian besar bakteri pembentuk inti es ialah bakteri filosfer (penghuni daun). Kebanyakan jaringan tanaman dapat mengalami lewat dingin secara meluas, namun kerusakan akibat pembekuan terjadi pada suhu -2 °C. Walaupun beberapa substansi alami seperti jaringan tanaman dan partikel-partikel tanah mengandung sejumlah inti es yang aktif membentuk es pada suhu -10 °C atau lebih rendah, substansi yang aktif membentuk es pada suhu asai di atas -5 °C di alam jarang sekali ditemukan (Lindow, 1983). Setetes air murni akan melewati lewat dingin hingga suhu -40 °C. Air ledeng dalam jumlah besar (lebih dari 10 ml) umumnya mengalami lewat dingin hingga suhu -8 °C. Kebanyakan spesies tanaman dapat mengalami lewat dingin hingga suhu sekitar -5 °C, dan tanaman yang peka terhadap pembekuan dapat menghilangkan kerusakan akibat pembentukan es di atas suhu -5 °C apabila tidak ada bakteri-bakteri pembentuk inti es pada tanaman tersebut (Gurian-Sherman dan Lindow, 1993).

Spesies bakteri pembentuk inti es merupakan penghuni umum pada tanaman. Jumlah populasi dari bakteri ini mencapai 10<sup>6</sup> sel/g jaringan tanaman. Dengan demikian jaringan tanaman di lapang pada umumnya membawa sejumlah besar bakteri pembentuk inti es (Lindow, 1993). Oleh karena spesies tanaman tertentu dapat terbunuh (mati) akibat pembentukan es oleh bakteri, maka tindakan atau perlakuan untuk mengurangi atau mengatasi kerusakan tanaman akibat pembekuan dapat dilakukan dengan menggunakan bakterisida maupun dengan menggunakan bakteri antagonis pada suhu udara minimum -5 °C atau lebih. Perlakuan tersebut dapat meminimumkan kerusakan tanaman akibat pembekuan. Hal ini akan dapat menekan hilangnya milyaran dolar hasil produksi per tahun, terutama pada beberapa spesies tanaman yang peka terhadap pembekuan (Gurian-Sherman dan Lindow, 1993).

Walaupun bakteri pembentuk inti es selalu merusak spesies-spesies tanaman yang peka terhadap pembekuan (*frost-sensitive*), bakteri tersebut dapat memainkan peranan yang memungkinkan spesies tanaman tahan beku (*hardy-frost*) dapat toleran terhadap pembentukan es. Gen pembentuk inti es pada bakteri telah dicoba diintroduksi ke tanaman *Solanum commersonii* melalui *A. tumefaciens*, ternyata inti es aktif pada

suhu  $-3^{\circ}\text{C}$  yang telah dapat dideteksi pada tanaman tersebut. Pembentukan inti es pada suhu yang relatif hangat dalam spesies tanaman tahan beku dapat mengatur untuk meningkatkan toleransinya terhadap kerusakan akibat pembekuan melalui lokalisasi air yang lewat dingin dalam jaringan tanaman (Gurian-sherman, 1993).

Inti es pada bakteri yang aktif pada suhu yang relatif hangat ( $> -5^{\circ}\text{C}$ ) secara potensial memainkan peranan penting secara praktis dalam pembuatan salju, perubahan cuaca, pembekuan beberapa jenis makanan, serta memungkinkan pemanfaatannya untuk membuat hujan buatan. Khusus dalam pembekuan makanan perlu dipikirkan juga bakteri pembawanya (pembawa gen *ice*<sup>+</sup>) supaya tergolong dalam kelompok yang aman (Generally Reconized As Safe = GRAS).

Akhir-akhir ini penggunaan gen *ice*<sup>+</sup> atau *inaZ* dari *P. syringae* untuk menyeleksi bakteri-bakteri filosoffer yang berpotensi sebagai biokontrol *X. campestris* pv. *glycines* 8Ra telah dilakukan di Indonesia. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8Ra diketahui sebagai penyebab penyakit pustul atau bisul bakteri pada tanaman kedelai. Introduksi gen *inaZ* ke *X. campestris* pv. *glycines* 8Ra menunjukkan bahwa gen *inaZ* dapat diekspresikan menghasilkan protein pembentuk inti es. *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8Ra hasil rekayasa genetika ini selanjutnya dapat digunakan untuk menyeleksi bakteri-bakteri filosoffer tanaman kedelai sebagai biokontrol *in planta*. Metode dengan menggunakan gen *inaZ* sebagai penanda molekuler maupun sebagai gen pelapor akan sangat membantu. Metode ini disamping mudah dan cepat dilakukan, juga andal (Mariani, 1995). Di laboratorium kami juga telah diintroduksi gen *ice*<sup>+</sup> atau *inaZ* ke bakteri lain, yaitu *Bradyrhizobium japonicum* (bakteri pembentuk bintil akar kedelai) melalui konjugasi. Konjugasi dapat terjadi dengan frekuensi tinggi dan *B. japonicum* mampu mengekspresikan gen *inaZ* tersebut. Namun demikian, *B. japonicum* hasil rekayasa genetika tersebut setelah diinfeksi ke kedelai, bintil akar yang terbentuk setelah dilakukan asai pembentukan inti es ternyata menunjukkan ketidakstabilan ekspresi gen *inaZ*. Dalam kasus ini gen *inaZ* tidak dapat digunakan sebagai penanda molekuler maupun sebagai gen pelapor pada fase bakteroid (*B. japonicum* yang ada di dalam bintil akar). Sepengetahuan kami, kedua hasil penelitian tersebut adalah yang pertama kali melaporkan bahwa gen *inaZ* dari *P. syringae* dapat diekspresikan pada *X. campestris* dan *B. japonicum*.

## FAKTOR-FAKTOR YANG BERPENGARUH

Banyak faktor yang mempengaruhi pembentukan inti es pada bakteri, baik faktor fisik maupun biokimiawi. Beberapa sifat secara kuantitatif dari bakteri tersebut perlu dikenali untuk memperkecil adanya hasil negatif yang keliru dari fenotipe yang diukur. Pembentukan inti es bukan merupakan karakteristik intrinsik dari setiap sel bakteri dari galur atau spesies yang menghasilkan inti es. Aktivitas pembentukan inti es sering diukur pada suhu  $-5$  hingga  $-10^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu ini frekuensi sel membentuk inti es dapat berubah dari  $10^0$  -  $10^{-9}$  per sel atau lebih rendah (Lindow *et al.*, 1982a). Variabilitas ekspresi yang besar dari aktivitas pembentukan inti es *in vitro* ternyata ditentukan secara genetik. Suhu pertumbuhan atau suhu inkubasi sel sebelum diuji aktivitas pembentukan inti

esnya mempunyai pengaruh yang besar pada ekspresi dan aktivitasnya. Frekuensi pembentukan inti es menurun dengan nyata jika galur pembentuk inti nukleasi es ditumbuhkan atau diinkubasi pada suhu lebih dari  $24^{\circ}\text{C}$  (Lindow, 1990).

Media kultur mempunyai pengaruh penting dalam ekspresi aktivitas pembentukan inti es dari kebanyakan galur bakteri. Pertumbuhan biakan pada media yang mengandung polialkohol seperti gliserol, manitol, sorbitol, dan sejenisnya dapat meningkatkan frekuensi pembentukan inti es (Lindow *et al.*, 1982a). Media King's B (KB) yang mengandung gliserol merupakan media umum yang dipakai untuk mendeteksi aktivitas pembentukan inti es. Biakan bakteri yang ditumbuhkan pada media cair yang diaerasi umumnya tidak mampu mengekspresikan aktivitas pembentukan inti es seefisien biakan yang ditumbuhkan pada media padat (Lindow, 1990). Umur biakan bakteri pada umumnya juga mempengaruhi frekuensi pembentukan inti es. Sel pada fase logaritmik mempunyai frekuensi pembentukan inti es  $10^2$  -  $10^5$  kali lebih rendah dibandingkan dengan sel-sel pada fase awal atau akhir stasioner bila ditumbuhkan dalam biakan cair. Biakan *P. syringae* yang ditumbuhkan pada media KB mengekspresikan frekuensi pembentukan inti es maksimum pada umur 2-4 hari jika ditumbuhkan mendekati suhu optimumnya untuk ekspresi aktivitas pembentukan inti es ( $18-24^{\circ}\text{C}$ ) (Lindow *et al.*, 1982b). Faktor pH juga menentukan ekspresi aktivitas pembentukan inti es. Ekspresi aktivitas pembentukan inti es dapat dikelompokkan menjadi tiga kelas berdasarkan kepekaannya terhadap pH. Ada yang peka pada pH 4.5, pH 5.5, dan pH 3.5 (Turner *et al.*, 1991). Beberapa senyawa kimia dapat juga mempengaruhi ekspresi aktivitas pembentukan inti es. Senyawa ini berperan sebagai inhibitor. Situs pembentukan inti es yang berhubungan atau berasosiasi dengan bakteri yang aktif membentuk inti es bersifat peka terhadap bermacam-macam bahan kimiawi seperti ion-ion logam berat (Cu, Zn) dan deterjen kation tertentu. Inhibitor tersebut, dalam beberapa menit hingga beberapa jam setelah aplikasi, akan membuat bakteri menjadi tidak aktif dalam membentuk inti es (Lindow, 1983).

Melihat kenyataan di atas, antisipasi terhadap faktor-faktor tadi menjadi perlu diperhatikan apabila kita ingin menggunakan jasa dari bakteri pembentuk inti es maupun gen yang aktif mensintesis protein pembentuk inti es untuk kegiatan-kegiatan praktis maupun kegiatan-kegiatan yang bersifat penelitian dasar. Dengan demikian hasil maksimal yang menguntungkan akan dapat diperoleh sesuai dengan tujuan kita.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arvanitis, C.V., G. Tegos, A. Perysinakis, J.J. Nieto, A. Ventosa, and C. Drinas. 1995. Development of A Gene Reporter System in Moderately Halophilic Bacteria by Employing The Ice Nucleation Gene of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3821-3825.
- Baertlein, D.A., S.E. Lindow, N.J. Panopoulos, S.P. Lee, M.N. Mindranos, and T.H. Chen. 1992. Expression of A Bacterial Ice Nucleation Gene in Plants. *Plant. Physiol.* 100:1730-1736.
- Chater, K.F. and D.A. Hopwood. 1989. Cloning and Molecular Analysis of Bacterial Genes, p. 53-57. *In* D.A.

- Hopwood and K.E. Chater (ed). *Genetics of Bacterial Diversity*. London: Academic Press.
- Drainas, A., G. Vartholomatos, and N.J. Panopoulos.** 1995. The Ice Nucleation Gene from *Pseudomonas syringae* as A Sensitive Gene Reporter for Promotor Analysis in *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:273-277.
- Georgakopoulos, D.G., M. Hendson, N.J. Panopoulos, and M.N. Shroth.** 1994. Cloning of A Phenazine Biosynthetic Locus of *Pseudomonas aureofaciens* PES12 and Analysis of Its Expression In Vitro with the Ice Nucleation Reporter Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2931-2938.
- Govindarajan, A.G., and S.E. Lindow.** 1988. Size of Bacterial Ice Nucleation Sites Measured in Situ Low Radiation Inactivation Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58:1334-1338.
- Gurian-Sherman, D. and S.E. Lindow.** 1993. Bacterial Ice Nucleation: Significance and Molecular Basis. *FASEB J.* 7:1338-1343.
- Kozloff, L.M., M.A. Turner, F. Arelano, and M. Lute.** 1991a. Phosphatidylinositol, A Phospholipid of Ice Nucleating Bacteria. *J. Bacteriol.* 173:2053-2060.
- Kozloff, L.M., M.A. Turner, and F. Arelano.** 1991b. Formation of Bacterial Membrane Ice Nucleating Lipoglycoprotein Complexes. *J. Bacteriol.* 173:6528-6536.
- Lindgren, P.B., R. Frederick, A.G. Govindarajan, N.J. Panopoulos, B.J. Staskawics, and S.E. Lindow.** 1989. An Ice Nucleation Reporter Gene System: Identification of Inducible Pathogenicity Genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *EMBO J.* 8:1291-1301.
- Lindow, S.E.** 1983. The Role of Bacterial Ice Nucleation in Frost Injury to Plant. *Ann. Rev. Phytopathol.* 21:363-384.
- Lindow, S.E.** 1990. Bacterial Ice Nucleation Activity. p. 428-434. In Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sand (ed). *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Academiai Kiado.
- Lindow, S.E.** 1991. Test of Specificity of Competition Around *Pseudomonas syringae* Strains on Plant Using Recombinant Ice-strains and Use of Ice Nucleation Genes as Probes of *In situ* Transcriptional Activity, p. 457-464. In H. Hennecke and D.P.S. Verina (ed). *Advances in Molecular Genetics of Plant-microbe Interaction*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
- Lindow, S.E.** 1993. Novel Method for Identifying Bacterial Mutant with Reduced Epiphytic Fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1586-1592.
- Lindow, S.E., D.C. Army, and C.D. Upper.** 1978. Distribution of Ice Nucleation-Active Bacteria on Plants in Nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:831-838.
- \_\_\_\_\_. 1982a. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plant. *Plant Physiol.* 70:1084-1089.
- Lindow, S.E., S.S. Hirano, W.R. Barchet, D.C. Army, and C.D. Upper.** 1982b. Relation between Ice Nucleation Frequency of Bacteria and Frost Injury. *Plant Physiol.* 70:1090-1093.
- Loper, J.E. and S.E. Lindow.** 1994. A Biological Sensor for Iron Available to Bacteria in Their Habitats on Plant Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1934-1941.
- Mariani.** 1995. Isolasi dan Seleksi Bakteri Filosfer yang Berpotensi untuk Biokontrol *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8Ra pada Tanaman Kedelai dengan Esei Nukleasi Es. Skripsi. Bogor: FMIPA Institut Pertanian Bogor.
- Orser, C., B.J. Staskawicz, N.J. Panopoulos, D. Dahlbeck, and S.E. Lindow.** 1985. Cloning and Expression of Bacterial Ice Nucleation Genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164:359-366.
- Ruggles, J.A., M.N. Marshall and R. Fall.** 1993. Kinetics of Appearance and Disappearance of Classes of Bacterial Ice Nucleation Support and Agregation Model for Ice Nucleus Assembly. *J. Bacteriol.* 175:7216-7221.
- Turner, M.A., F. Arelano, and L.M. Kozloff.** 1991. Component of Ice Nucleation Structures of Bacteria. *J. Bacteriol.* 173:6515-6527.