

# Isolasi Bakteri Luminisensi pada Cumi-cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi* (Isolation of Luminescent Bacteria on *Loligo duvauceli* and *Euprymna berryi* squid)

Abdul Kodir Jaelani, Delianis Pringgenies\*

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang, 50275, Indonesia

\*Corresponding authors :pringgenies@yahoo.com

Diterima : 12 Januari 2019 Direvisi : 20 Februari 2019 Disetujui : 14 Maret 2019

## ABSTRACT

Bioluminescence is known to be found in squids. Bioluminescence occurs as a result of reactions from within the body (intrinsic bioluminescence) or by luminescent bacteria that are outside the body (extrinsic bioluminescence). This study aims to examine the results of the isolation of luminescent bacteria found in the light organs of *Loligo duvauceli* and *Euprymna berryi* squid. Squid sampling was carried out in the waters of Awur Bay, Jepara. Meanwhile, bacterial isolation and analysis were carried out in the Laboratory of Aquatic Animal Health Management (MKHA) of the Central for Brackish Water Cultivation Development (BBPBAP) Jepara. The research method used in this research is descriptive method with the sampling technique using purposive sampling technique. The results of the research on *Loligo duvauceli* squid obtained 2 isolates of luminescent bacteria, 1 isolate from N.A. and 1 isolate from TCBSA media. Whereas in *Euprymna berryi* squid there were also 2 isolates, 1 isolate from N.A. and 1 isolate from TCBSA media. The glow produced by luminescent bacteria is bluish green. In general, the luminescent bacteria isolated from the *Loligo duvauceli* squid was stronger than the light rays of the bacteria isolated from the *Euprymna berryi* squid. The total number of luminescent bacterial colonies found in the light organ of *Loligo duvauceli* squid was 15.47.10<sup>8</sup> CFU / mL. While the total number of luminescent bacterial colonies in the light organ of the squid *Euprymna berryi* was 15.1.10<sup>7</sup> CFU / mL.

**Keywords:** Awur Bay, *Euprymna berryi*, Isolation of luminescent bacteria, the light organs, *Loligo duvauceli*

## ABSTRAK

Bioluminisensi terjadi akibat reaksi dari dalam tubuh (intrinsic bioluminescence) atau oleh bakteri luminisensi yang terdapat di luar tubuh (extrinsic bioluminescence). Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji hasil isolasi bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi*. Pengambilan sampel cumi dilaksanakan di perairan Teluk Awur, Jepara. Sedangkan isolasi bakteri dan analisa dilaksanakan di laboratorium Manajemen Kesehatan Hewan Akuatik (MKHA) Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif dengan teknik pengambilan sampel menggunakan teknik *purposive sampling*. Hasil penelitian pada cumi *Loligo duvauceli* diperoleh 2 isolat bakteri luminisensi, 1 isolat dari media N.A. dan 1 isolat dari media TCBSA. Sedangkan pada cumi *Euprymna berryi* juga 2 isolat, 1 isolat dari media N.A. dan 1 isolat dari media TCBSA., sedangkan pada media TCBSA rata-rata bakteri luminisensi berpendar selama 44 jam 30 menit. Pemendaran cahaya yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi berwarna hijau kebiruan. Secara umum pemendaran cahaya bakteri luminisensi yang diisolasi dari cumi *Loligo duvauceli* lebih kuat daripada pemendaran cahaya dari bakteri yang diisolasi dari cumi *Euprymna berryi*. Jumlah total koloni bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* sebanyak 15,47.10<sup>8</sup> CFU/mL. Sedangkan jumlah total koloni bakteri luminisensi pada organ cahaya cumi *Euprymna berryi* sebanyak 15,110<sup>7</sup> CFU/mL.

**Kata kunci:** *Euprymna berryi*, Isolasi bakteri luminisensi, *Loligo duvauceli*, Teluk Awur, organ cahaya

## PENDAHULUAN

Bioluminisensi merupakan fenomena yang cukup menarik di lingkungan laut. Bioluminisensi merupakan sumber cahaya yang utama di laut dalam (Reynolds dan Lutz, 2001). Tidak seperti cahaya yang lain, bioluminisensi memiliki keunikan tersendiri. Salah satu keunikan dari bioluminisensi adalah cahaya yang dipancarkan pada proses bioluminisensi merupakan cahaya yang "dingin". Cahaya bioluminisensi dihasilkan dari radiasi panas yang sangat

kecil Cephalopoda diketahui dapat memancarkan cahaya yang dikenal dengan peristiwa bioluminisensi. Bioluminisensi pada Cephalopoda ada yang dihasilkan dari reaksi biokimia dari dalam tubuh (*intrinsic bioluminescence*) atau oleh bakteri-bakteri luminisensi yang berasosiasi dengan Cephalopoda (*extrinsic bioluminescence*) (Dunlap, 2009; Guerrero-Ferreira dan Nishiguchi, 2009).

Hingga kini pengetahuan tentang bioluminisensi pada cumi-cumi di Indonesia belum berkembang sehingga belum banyak diketahui jenis cumi-cumi yang dapat melakukan peristiwa bioluminisensi. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan guna menambah informasi tentang bioluminisensi pada cumi-cumi yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi. Cumi-cumi Hawaii (*Euprymna scolopes*) memberikan informasi tentang jenis bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi tersebut, yakni *Vibrio fischeri* (Naughton dan Mandel, 2012). Bioluminisensi pada Cephalopoda yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi hanya terbatas pada famili Sepiolidae dan Loligonidae (Schleicher dan Nyholm, 2011). Mekanisme keberadaan bakteri luminisensi pada organ cahaya cumi-cumi masih menjadi perdebatan. Bakteri luminisensi tidak diturunkan melalui induk cumi-cumi, tetapi setiap individu cumi-cumi memasukan bakteri luminisensi dari lingkungan luar (Norsworthy dan Visick, 2013; Nishiguchi et al., 2014). Ketika bakteri tersebut mencapai kepadatan sel yang tinggi, pancaran cahaya yang dihasilkan dapat dilihat dengan mata telanjang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji hasil isolasi bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang bakteri luminisensi yang berasosiasi dengan cumi-cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi*.

## MATERI DAN METODE

### Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode penelitian deskriptif yaitu metode penelitian yang bertujuan untuk membuat pencandraan mengenai situasi atau kejadian secara sistematis, faktual dan akurat tentang fakta-fakta dan sifat populasi tertentu.

### Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel cumi-cumi dilakukan dengan menggunakan metode *purposive sampling* di perairan Teluk Awur, Jepara yakni dengan mengambil subjek bukan berdasarkan atas strata, random atau daerah, tetapi berdasarkan tujuan tertentu.

Pengambilan sampel cumi-cumi dilakukan dengan menggunakan jaring bagan yang terbuat dari nylon. Cumi-cumi yang tertangkap langsung dimasukkan ke dalam *coolbox* agar kondisi sampel tidak rusak. Selanjutnya sampel cumi-cumi dibawa ke laboratorium Manajemen Kesehatan Akuatik (MKHA) Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) untuk dilakukan isolasi bakteri luminisensi dari organ cahaya cumi-cumi.

### Pembuatan Media Kultur

Media kultur yang berupa nutrient agar dan Thiosulphat Citrat Bile salt- Sucrose Agar dilakukan dengan menimbang bahan-bahan kimia. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabu Erlenmeyer, lalu dituangkan aquadest hingga 1 liter dan dipanaskan menggunakan pemanas yang dilengkapi dengan pengaduk (*stirrer with heater*) sampai mendidih. Kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit, kecuali untuk media TCBSA tidak perlu di *autoclave*. Selagi masih hangat, agar dituang ke cawan petri yang sudah disterilkan kemudian disimpan dalam suhu ruangan dengan posisi terbalik. Setelah 24 jam baru dapat digunakan.

### Isolasi Bakteri Luminisensi dari Organ Cahaya Cumi-cumi

Isolasi bakteri luminisensi dilakukan dengan cara mengambil organ cahaya cumi-cumi yang menempel pada sebelah kanan dan kiri kantong tinta cumi-cumi, Organ cahaya tersebut diambil dan dibersihkan dari cairan tinta dengan menggunakan larutan trisalt. Hal yang sama dilakukan pada cumi-cumi lain hingga didapatkan 1 gram organ cahaya.

Setelah diperoleh 1 gram organ cahaya, kemudian organ cahaya tersebut dihaluskan dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan larutan trisalt. Pengenceran  $10^{-1}$  diperoleh dengan menuangkan 9 mL trisalt ke dalam 1 gram organ cahaya yang telah dihaluskan. Kemudian diambil sebanyak 1 mL, dari pengenceran  $10^{-1}$  dan dituangkan ke dalam 9 mL trisalt sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-2}$ . Begitu seterusnya sampai pengenceran  $10^{-7}$ . Setiap hasil pengenceran dilakukan penggojogan (homogenisasi) menggunakan sentrifuge. Dari tiap hasil pengenceran larutan organ cahaya diambil sebanyak 0,1 mL menggunakan pipet steril untuk diinokulasikan secara aseptik pada media nutrisi agar dan TCBSA pada cawan petri. Setelah semua hasil pengenceran diinokulasikan pada kedua media, cawan petri yang berisi media diletakkan secara terbalik dan disimpan pada ruang gelap

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi Bakteri Luminisensi

Bakteri luminisensi diambil dari organ cahaya cumi-cumi yang melekat pada kantong tinta cumi-cumi. Organ cahaya cumi diperoleh dengan membelah bagian mantel cumi pada bagian ventral sehingga terlihat kantong tinta cumi-cumi. Isolasi bakteri luminisensi dilakukan dengan mengamati morfologi koloni bakteri luminisensi yang telah tumbuh pada media Nutrien Agar dan TCBSA. Pengamatan hasil isolasi bakteri meliputi warna, bagian tepi, bentuk permukaan serta lapisan bening di sekitar koloni. Hasil isolasi bakteri luminisensi dari organ cahaya cumi-cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi* tercantum pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Isolasi Bakteri Luminisensi dari Organ Cahaya Cumi *Loligo Duvauceli* dan *Euprymna berryi*

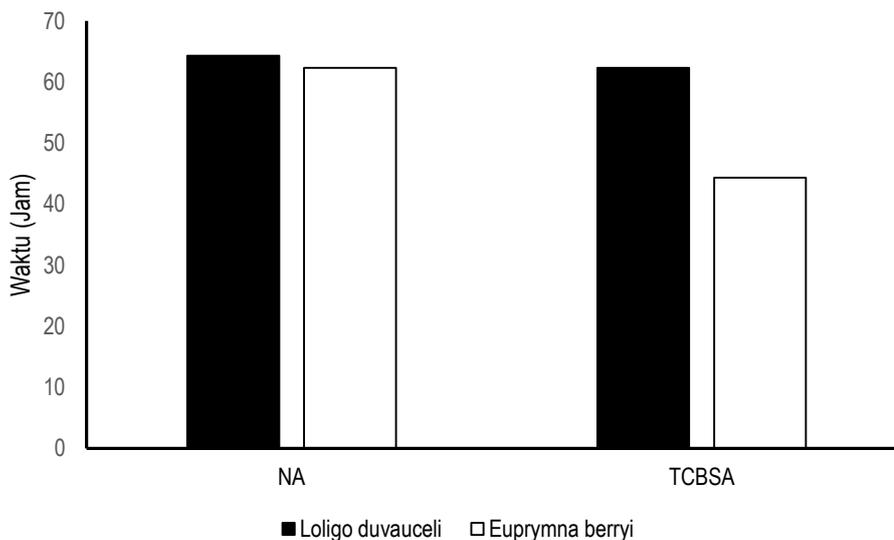
Media	<i>L.duvauceli</i>	<i>E.berryi</i>
Nutrien Agar	1 isolat	1 isolat
TCBSA	1 isolat	1 isolat

Morfologi koloni dari keempat isolat tersebut sama yakni koloni berwarna putih susu, bagian tepi koloni rata, permukaan koloni cembung dan terdapat lapisan bening disekitar koloni. Hasil kultur bakteri dari dua organ cahaya cumi yang berbeda dihasilkan sebanyak 4 isolat bakteri luminisensi yang mampu tumbuh pada 2 media yang berbeda, yakni Nutrien Agar dan TCBSA. Hasil isolasi bakteri luminisensi dapat dilihat pada Tabel 1. Keempat isolat tersebut mempunyai morfologi koloni yang sama yakni koloni berwarna putih susu, bagian tepi koloni rata, permukaan koloni cembung dan terdapat lapisan bening disekitar koloni. Bentuk koloni merupakan ciri khas bagi suatu spesies tertentu (Allegrucci and Sauer, 2007). Besar kecilnya koloni, mengkilat tidaknya, halus kasarnya permukaan dan warna koloni merupakan sifat yang diperlukan untuk identifikasi suatu spesies.

Tumbuhnya bakteri luminisensi pada media Nutrien Agar dan TCBSA berarti bahwa bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi dapat diisolasi dan dikultur pada media tersebut. Hal tersebut juga berarti bahwa komposisi nutrisi dan kondisi lingkungan yang dibutuhkan oleh bakteri luminisensi terpenuhi pada kedua media agar. Mikroorganisme di laboratorium dibutuhkan nutrisi dan kondisi lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya (Widder, 2010).

### Waktu Pemendaran Cahaya oleh Bakteri Luminisensi

Pengamatan lamanya bakteri luminisensi memendarakan cahaya dilakukan setiap jam sejak bakteri luminisensi diisolasi. Pengamatan pemendaran cahaya bakteri luminisensi tersebut dilakukan dalam ruang gelap. Lamanya pemendaran cahaya oleh bakteri luminisensi yang diisolasi dari *Loligo duvauceli* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik Lama Pemendaran Cahaya Bakteri Luminisensi

Berdasarkan Gambar 1 terlihat adanya perbedaan waktu lamanya pemendaran cahaya oleh bakteri luminisensi dari masing-masing isolat. Isolat Ln yang merupakan isolat dari organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* yang ditanam pada media NA, memendarkan cahaya rata-rata selama 63 jam 30 menit. Sedangkan isolat Lt yang merupakan isolat bakteri luminisensi dari cumi *Loligo duvauceli* pada media TCBSA memendarkan cahaya rata-rata selama 62 jam 30 menit. Isolat bakteri luminisensi dari organ cahaya cumi *Euprymna berryi* pada media Nutrien Agar (isolat En) rata-rata memendarkan cahaya selama 62 jam 30 menit. Sedangkan pada media TCBSA bakteri luminisensi dari *Euprymna berryi* rata-rata berpendar selama 44 jam 30 menit.

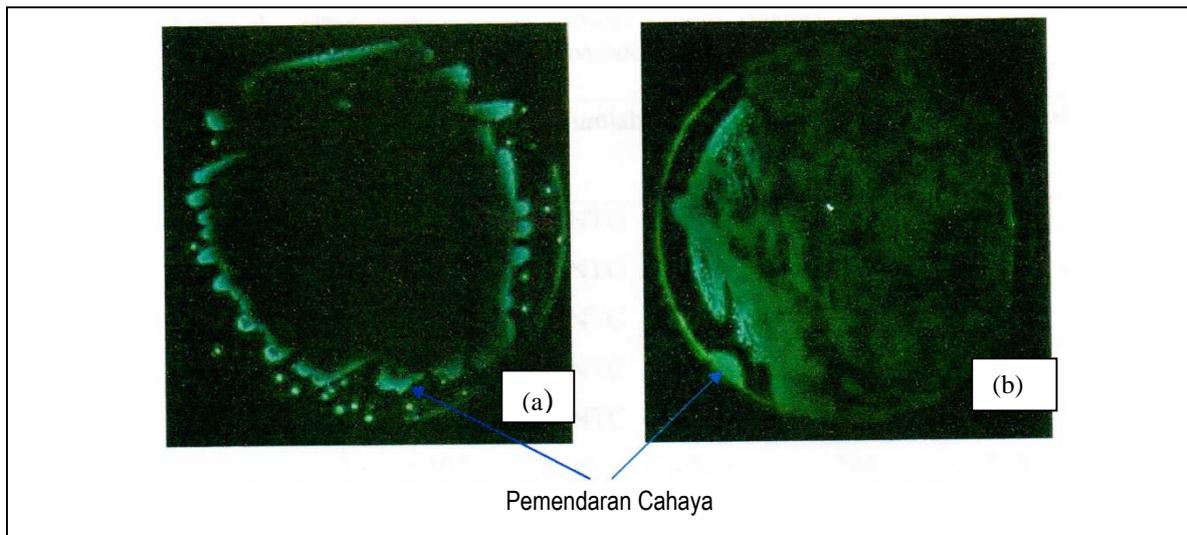
Pemendaran cahaya bakteri luminisensi di media Nutrien Agar berlangsung lebih lama daripada di media TCBSA. Perbedaan lamanya pemendaran cahaya diduga berkaitan dengan komposisi nutrisi yang terkandung dalam kedua media. Komposisi nutrisi yang terkandung pada media Nutrien Agar lebih sesuai dengan yang dibutuhkan oleh bakteri luminisensi, sehingga bakteri luminisensi pada Nutrien Agar dapat tumbuh dengan baik dan memendarkan cahaya lebih lama. Nutrien yang terkandung dalam media dapat digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan (Bristow et al., 2017). Untuk terus dapat berkembangbiak dan berfungsi secara baik, suatu organisme membutuhkan sumber energi, karbon untuk pembentukan sel baru, dan nutrisi (elemen) anorganik. Jika komposisi nutrisi pada media Agar sesuai yang dibutuhkan oleh bakteri maka bakteri dapat tumbuh dengan baik dan substrat yang dibutuhkan dalam reaksi luminisensi terpenuhi sehingga pemendaran cahaya dapat berlangsung lebih lama. Reaksi luminisensi yang terjadi dikatalisis oleh enzim luciferin yang mempunyai kaitan sangat erat dengan kandungan nutrisi dalam jalur metabolisme dari reaksi luminisensi (Widder, 2010).

**Kekuatan Pemendaran Cahaya Bakteri Luminisensi**

Kekuatan pemendaran cahaya yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi yang diisolasi dari organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi* tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Kekuatan pemendaran cahaya bakteri luminisensi dari tiap isolat

Isolat	Kekuatan Pemendaran cahaya
Isolat <i>Loligo</i> pada media NA	Kuat
Isolat <i>Loligo</i> pada media TCBSA	Lemah
Isolat <i>Euprymna</i> pada media NA	lemah
Isolat <i>Euprymna</i> pada media TCBSA	Sangat lemah



**Gambar 2.** Pemendaran Cahaya bakteri luminesensi (a) Isolat *Loligo* pada media NA, (b) Isolat *Loligo* pada media TCBSA

Hasil pengamatan kekuatan pemendaran cahaya oleh bakteri luminisensi dari tiap isolat tercantum pada Tabel 2. Pemendaran cahaya yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi berwarna hijau kebiruan (Gambar 2). Secara umum pemendaran cahaya bakteri luminisensi yang diisolasi dari cumi *Loligo duvauceli* lebih kuat daripada pemendaran cahaya dari bakteri yang diisolasi dari cumi *Euprymna berryi*. Pemendaran cahaya yang dihasilkan oleh spesies cumi yang sama tetapi pada media yang berbeda juga menunjukkan perbedaan. Pemendaran cahaya yang dihasilkan oleh bakteri luminisensi dari kedua spesies cumi pada media Nutrien Agar lebih kuat daripada pemendaran cahaya oleh bakteri pada media TCBSA. Perbedaan ini diduga tidak lepas kaitannya dengan kesesuaian komposisi nutrisi yang terkandung pada Nutrien Agar dengan yang dibutuhkan oleh bakteri luminisensi. Selain itu, perbedaan kekuatan pemendaran cahaya diduga berkaitan dengan spesies bakteri luminisensi yang berbeda dari tiap isolat. Bakteri *Photobacterium phosphoreum* merupakan bakteri yang paling terang dari semua bakteri luminisensi (et al., 2009). Cahaya yang dipancarkan oleh bakteri dapat dilihat oleh mata telanjang jika kepadatan sel bakteri telah memenuhi jumlah tertentu serta dipengaruhi pula oleh akumulasi molekul aktivator (*autoinducer*).

### Enumerisasi Bakteri Luminisensi

Hasil penghitungan jumlah koloni bakteri luminisensi yang terdapat pada organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi* tercantum pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri Luminisensi dari Organ Cahaya Cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi*.

Spesies	Tingkat pengenceran	Jumlah koloni		Rata - rata	Total koloni
<i>L. duvauceli</i>	1. 10 <sup>-1</sup>	TNTC	TNTC	-	
	1. 10 <sup>-2</sup>	TNTC	TNTC	-	
	1. 10 <sup>-3</sup>	TNTC	TNTC	-	
	1. 10 <sup>-4</sup>	TNTC	TNTC	-	
	1. 10 <sup>-5</sup>	TNTC	TNTC	-	
	1. 10 <sup>-6</sup>	295	289	294	294 10 <sup>6</sup>
	1. 10 <sup>-7</sup>	279	281	280	280 10 <sup>7</sup>
<i>E. berryi</i>	1 10 <sup>-6</sup>	180	184	182	182 10 <sup>6</sup>
	1 10 <sup>-7</sup>	13	11	12	12 10 <sup>7</sup>

Keterangan: TNTC : Too numerous to count

Media yang digunakan dalam enumerisasi bakteri luminisensi ialah Nutrien dari Tabel 4 diketahui bahwa jumlah koloni yang tumbuh dari cumi *Loligo duvauceli* lebih banyak dibandingkan pada cumi *Euprymna berryi*. Perbedaan tersebut diduga berkaitan erat dengan kesesuaian komposisi nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri luminisensi untuk pertumbuhannya. Sehingga dapat diartikan bahwa Nutrien Agar lebih sesuai untuk bakteri luminisensi dari cumi *Loligo duvauceli* daripada untuk bakteri luminisensi dari cumi *Euprymna berryi* (Schleicher dan Nyholm, 2011). Nutrien yang terkandung dalam media dapat digunakan untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme dan pergerakan. Untuk terus dapat berkembangbiak dan berfungsi secara baik, suatu organisme membutuhkan sumber energi, karbon untuk pembentukan sel baru, dan nutrisi (elemen) inorganik

### KESIMPULAN

Bakteri Luminisensi dari cumi *Loligo duvauceli* dan *Euprymna berryi* dapat diisolasi dan dikultur baik pada media Nutrien Agar maupun pada Thiosulphat Citrat Bile salt-Sucrose Agar (TCBSA). Pemendaran cahaya yang lebih lama dihasilkan oleh isolat bakteri luminisensi dari cumi *Loligo duvauceli* pada media Nutrien Agar yakni selama 63 jam 30 menit. Pemendaran cahaya yang lebih kuat dihasilkan oleh isolat bakteri luminisensi dari cumi *Loligo duvauceli* pada media Nutrien Agar. Jumlah total koloni bakteri luminisensi per mililiter pada organ cahaya cumi *Loligo duvauceli* sebanyak 15,47 10<sup>8</sup> CFU/mL, lebih banyak daripada yang terdapat pada organ cahaya cumi *Euprymna berryi* yakni 15,1 10<sup>7</sup> CFU/mL. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi bakteri luminisensi serta intensitas cahaya yang dipancarkan.

**DEKLARASI**

Penulis tidak ada *conflict of interest*

**DAFTAR PUSTAKA**

- Allegrucci, M., Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 189(5):2030–2038. <https://doi.org/10.1128/JB.01369-06>
- Bristow, L. A., Mohr, W., Ahmerkamp, S., Kuypers, M. M. M. (2017). Nutrients that limit growth in the ocean. *Current Biology*, 27(11):R474–R478. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.030>
- Dunlap, P. V. (2009). Bioluminescence, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, 45–61.
- Emma K., R., Alexander M., K., Nataliya A., T., Svetlana E., M. (2009). Bioluminescent Bioassays Based on Luminous Bacteria. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 2(4):418–452. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0222>
- Guerrero-Ferreira, R. C., Nishiguchi, M. K. (2009). Ultrastructure of light organs of loliginid squids and their bacterial symbionts: A novel model system for the study of marine symbioses. *Vie Milieu Paris*, 59(3–4):307–313.
- Naughton, L. M., Mandel, M. J. (2012). Colonization of *Euprymna scolopes* squid by *Vibrio fischeri*. *Journal of Visualized Experiments*, 612–7. <https://doi.org/10.3791/3758>
- Nishiguchi, M. K., Lopeza, J. E., Boletzky, S. V. (2014). Enlightenment of old ideas from new investigations: more questions regarding the evolution of bacteriogenic light organs in squids. *Evolution & Development*, 23(1):1–7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- Norsworthy, A. N., Visick, K. L. (2013). Gimme shelter: how *Vibrio fischeri* successfully navigates an animal's multiple environments. *Frontiers in Microbiology*, 4(November):1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00356>
- Reynolds, G. T., Lutz, R. A. (2001). Sources of Light in the Deep Ocean. *Reviews of Geophysics*, 39(1):123–136. <https://doi.org/10.1029/1999RG000071>
- Schleicher, T. R., Nyholm, S. V. (2011). Characterizing the host and symbiont proteomes in the association between the bobtail squid, *Euprymna scolopes*, and the bacterium, *Vibrio fischeri*. *PLoS ONE*, 6(10):. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025649>
- Widder, E. A. (2010). Bioluminescence in the ocean: Origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science*, 328(5979):704–708. <https://doi.org/10.1126/science.1174269>