

# AMPLIFIKASI GEN *CRY1* DAN ANALISIS GENOM ISOLAT *Bacillus thuringiensis* LOKAL

Dwi Suryanto

Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Sumatera Utara, Jln. Bioteknologi No. 1, Kampus USU, Medan 20155

## ABSTRACT

A study on amplification of *Cry1* gene and genome analysis of local isolate of *Bacillus thuringiensis* TU1 has been done. Amplification was done for *cryI* gene by PCR-technique. Genome analysis was performed using pulsed-field gel electrophoresis. Insecticidal specificity assay of the isolate to larvae was done in larvae of *Heliothis armigera*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti*, and *Culex* sp. Isolate of commercial strain, *B. thuringiensis* var *kurstaki* strain HD-7, was used as control for amplification of *cryI* gene, genome analysis, and insecticidal specificity assay. The result showed that insecticidal specificity assay of the isolates of both TU1 and commercial have similar spectrum of toxicity to the larvae. Amplification of *cryI* gene resulted to a fragment of approximately 550 bp in both TU1 and commercial. Genome profiles of TU1 and commercial strain were similar.

**Key words:** *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis*, *Culex* sp., *Heliothis armigera*, *Plutella xylostella*

## PENGANTAR

*Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri bersifat Gram-positif, aerob, saprofit pembentuk endospora yang terdapat di tanah, air, dan di permukaan tumbuhan (Kawalek *et al.*, 1995). Berbagai jenis isolat dan subspecies *B. thuringiensis* sangat dikenal sebagai sumber yang bernilai untuk biopestisida penting komersial (López-Meza dan Ibarra, 1996). Bakteri ini memenuhi syarat sebagai agen pengendali mikrobiologi terhadap hama dan vektor penyakit tumbuhan sehingga aplikasi biopestisida ini cepat tersebar (Ben-Dov *et al.*, 1999).

Semua subspecies *B. thuringiensis* yang dikenal memproduksi sejumlah besar protein kristal insektisida yang bersegregasi dalam tubuh paraspora ( $\delta$ -endotoksin) selama masa sporulasi, yang ketika ditelan, bersifat toksik untuk berbagai macam serangga (Agaisse dan Lereclus, 1995). Kristal protein ini memiliki aktivitas toksik spesies terhadap serangga tertentu (Lambert *et al.*, 1996). Protein *CryI* diketahui toksik terhadap Lepidoptera, sedang *CryII* toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera. *CryIII* diketahui mampu membunuh Coleoptera, dan *CryIV* toksik terhadap Diptera (Agaisse dan Lereclus, 1995). Oleh karena memberikan derajat toksisitas dan aktivitas insektisida yang berbeda, perlu diketahui marka molekuler yang dapat membedakan antarstrain (Bravo *et al.*, 1998). Gen protein kristal insektisida terdapat dalam plasmid konjugasi dan tersusun dalam klaster atau dalam operon diperantarai oleh *insertion sequences* (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995). Karakterisasi koleksi strain *B. thuringiensis* dapat membantu mengetahui peran bakteri ini di lingkungan dan distribusi gen *Cry* (Bravo *et al.*, 1998).

Metode penapisan strain yang diikuti dengan pengujian spesifisitas insektisida biasa dilakukan untuk mendapatkan strain-strain baru. Di samping itu karakterisasi terhadap gen *Cry* juga dilakukan mengikuti penapisan strain. Metode yang dianggap paling berhasil untuk mengarakterisasi gen *Cry* adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Bravo *et al.*, 1998; Ben-Dove *et al.*, 1997; Kuo dan Chak, 1996; Cerón *et al.*, 1995). Saat ini, metode molekuler seperti *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) dari kromosom telah digunakan untuk menentukan kekerabatan genetik mikroorganisme (Liu *et al.*, 1997; Rivera & Priest, 2003). PFGE telah berhasil dengan baik memisahkan fragmen DNA genom bakteri ukuran besar. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian spesifisitas insektisida isolat lokal TU1, amplifikasi gen *cry*, dan membandingkan genom total dengan teknik PFGE.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bakteri dan Kultur

Isolat bakteri *B. thuringiensis* berasal dari isolasi sebelumnya dari tanah yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas MIPA, USU, Medan. Sebagai pembanding digunakan isolat *B. thuringiensis* var *kurstaki* strain HD-7 yang diisolasi dari bioinsektisida komersial. Isolat uji ditumbuhkan dalam media untuk *B. thuringiensis* (Travers *et al.*, 1987).

### Uji Spesifisitas Insektisida *B. thuringiensis* terhadap Beberapa Jenis Larva

Uji spesifisitas insektisida dilakukan dengan menggunakan larva uji: instar 3 *Heliothis armigera*

(Lepidoptera), instar 3 *Plutella xylostella* (Lepidoptera), instar 4 *Aedes aegypti* (Diptera), dan instar 4 *Culex* sp. (Diptera) seperti yang dilakukan oleh López-Meza dan Ibarra (1996) dan Thomas *et al.* (2000). Pemberian makan dilakukan dengan menambahkan  $\approx 10^8$  sel fase akhir pertumbuhan *B. thuringiensis* dalam 1 g diet artifisial atau alami. Spesifisitas insektisida dan kemampuan isolat TU1 membunuh larva dibandingkan dengan isolat komersial dan bubuk bioinsektisida komersial. Notasi yang sama diberikan jika kedua isolat memiliki kemampuan yang kurang lebih sama dalam membunuh larva uji.

### Amplifikasi Gen *Cry1* Isolat *B. thuringiensis*

Primer spesifik gen *cry1* 5'-CTGGATTTACAGG TGGGGATAT-3' (d) dan primer 5'-TGAGTCGCTT CGCATATTTGACT-3' (r) digunakan dalam PCR 30 siklus dengan kondisi denaturasi tunggal 95° C selama 1 menit, denaturasi 95° C selama 1 menit, pelekatan 52° C selama 1 menit, dan pemanjangan 72° C selama 1 menit, tambahan pemanjangan 72° C selama 5 menit dengan cetakan DNA dari isolat TU1 dan isolat komersial (Bravo *et al.*, 1998). Visualisasi hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis *gel* mini.

### Keragaman Genetik *B. thuringiensis* dengan Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

Untuk melihat keragaman genetik isolat dilakukan pekerjaan sesuai dengan prosedur kerja yang dilakukan oleh Suryanto dan Suwanto (2002). Penyiapan DNA genom total dan restriksi enzim menggunakan metode Smith dan Cantor (1987). PFGE untuk memperoleh profil makrorestriksi menggunakan CHEF-DR®II (Bio-Rad, Richmond, CA). Enzim restriksi yang digunakan adalah *SmaI* (Rivera dan Priest, 2003). Genom *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, yang dipotong dengan enzim restriksi *AseI* digunakan sebagai penanda molekuler.

### Penyiapan DNA dan kultur

Metode fenol-kloroform-isoamilalkohol yang dimodifikasi dan presipitasi etanol dingin digunakan untuk mengekstraksi DNA genom (Sambrook *et al.*, 1989). Sebanyak 5 ml kultur sel umur 16 jam disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi dicuci dengan 1 ml 0,85% NaCl kemudian diresuspensi dengan 500  $\mu$ l 1 $\times$ TE. Suspensi ini ditambah dengan 100  $\mu$ l lisozim (50 mg/ml) dan diinkubasi pada 37° C selama 1 jam. Inkubasi dilakukan kembali setelah pada 65° C selama

1 jam setelah penambahan 100  $\mu$ l 10% SDS. Penambahan 10  $\mu$ l Proteinase-K (10 mg/ml) dilakukan setelah inkubasi selama 1 jam pada 37° C. Setelah perlakuan dengan 100  $\mu$ l NaCl dan 100  $\mu$ l CTAB/NaCl (65° C), suspensi diinkubasi pada 65° C selama 20 minutes. Perlakuan fenol: kloroform: isoamilalkohol (25 : 24 : 1) selanjutnya diberikan sesuai dengan prosedur. Presipitasi dilakukan dengan etanol dingin.

## HASIL

### Uji Spesifisitas Insektisida *B. thuringiensis* Terhadap Beberapa Jenis Larva

Uji spesifisitas insektisida isolat TU1, isolat komersial, dan bioinsektisida komersial bubuk terhadap larva beberapa jenis serangga disajikan dalam Tabel 1. Kelihatannya semua perlakuan mampu membunuh larva *H. armigera*, *P. xylostella*, *A. aegypti*, dan *Culex* sp. Namun demikian dalam pengamatan kelihatan bioinsektisida komersial bubuk yang digunakan sebagai kontrol secara umum terlihat lebih mampu membunuh semua jenis larva. Kemampuan daya bunuh isolat mungkin dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi kristal protein saat aplikasi.

**Tabel 1.** Spesifisitas insektisida dan kemampuan isolat TU1, isolat komersial, dan bioinsektisida komersial bubuk dalam membunuh larva serangga uji

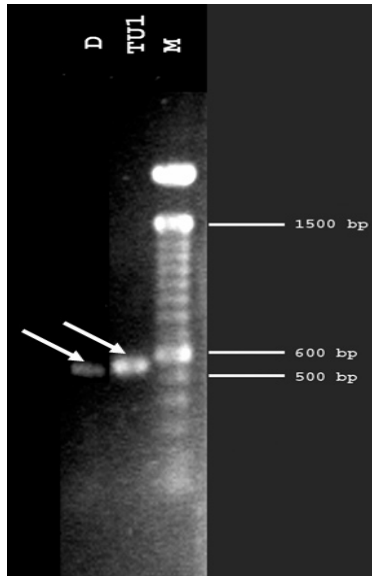
	TU1	Isolat komersial	Bioinsektisida komersial bubuk
<i>H. armigera</i>	++	+++	+++
<i>P. xylostella</i>	++	++	+++
<i>A. aegypti</i>	++	+	+++
<i>Culex</i> sp.	++	++	++

Keterangan:

- + : kemampuan membunuh kurang
- ++ : kemampuan membunuh sedang
- +++ : kemampuan membunuh tinggi

### Amplifikasi Gen *Cry1* Isolat *B. thuringiensis*

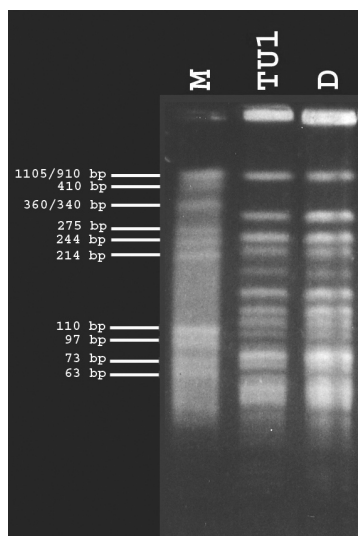
Amplifikasi dengan menggunakan primer yang digunakan Bravo *et al.* (1998) berhasil mengamplifikasi gen *cry1* isolat TU1 dan isolat komersial (Gambar 1) dengan pita yang dihasilkan sekitar 550 pb. Primer ini dirancang khusus untuk mengamplifikasi gen *cry1*. Menurut Bravo *et al.* (1998), primer ini berhasil mengamplifikasi hampir semua jenis gen *cry1* dengan ukuran pita yang dihasilkan antara 543–594 pb.



**Gambar 1.** Hasil amplifikasi gen *cry1* yang dilakukan terhadap isolat TU1 dan isolat komersial (D)

### Keragaman Genetik *B. thuringiensis* dengan PFGE

Hasil analisis genetik MFLP dengan PFGE terhadap genom total isolat disajikan pada Gambar 2. Dari hasil ini terlihat bahwa kedua isolat mempunyai pola profil yang sama dengan pemotongan enzim restriksi *SmaI*.



**Gambar 2.** Profil genom total isolat TU1 dan isolat komersial (D) yang dipotong dengan *SmaI*. M merupakan penanda genom *R. sphaeroides* 2.4.1 yang dipotong dengan *AseI*

### PEMBAHASAN

Banyak serangga hama merupakan anggota ordo Lepidoptera and Diptera. Untuk tujuan pengendalian

hama ini dirasakan perlu untuk mencari protein insektisida baru yang dapat membantu mengendalikannya. Fokus utama dalam mempelajari strain *B. thuringiensis* adalah produksi inklusi kristal protein oleh organisme ini selama sporulasi.  $\delta$ -endotoksin *B. thuringiensis* dikenal kemampuannya mengendalikan berbagai serangga hama termasuk Lepidoptera dan Diptera (Lambert *et al.*, 1996; Kawalek *et al.*, 1995). Dalam penelitian ini diuji spesifisitas insektisida dari isolat lokal TU1 terhadap beberapa larva Lepidoptera dan Diptera.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat TU1 dapat membunuh larva, dengan variasi kemampuan mematikan. Meski secara umum bioinsektisida komersial menunjukkan performa yang lebih baik dalam mengendalikan larva serangga, namun kelihatannya spektrum toksisitas isolat TU1 memiliki kecenderungan yang mirip dengan isolat komersial. Hal ini boleh jadi disebabkan oleh adanya gen penyandi kristal protein yang mirip pada kedua isolat. Ben-Dov *et al.* (1997) melihat bahwa strain *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 sedikit-tidaknya memiliki satu gen *cryI* dan juga gen *cry2Ab*, yang masing-masing toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera. Kemampuan spesifik strain *B. thuringiensis* semacam ini juga dilaporkan oleh Lambert *et al.* (1996). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa di daerah Sumatera Utara terdapat isolat bakteri *B. thuringiensis* yang potensial untuk dikembangkan menjadi bioinsektisida. Pencarian terhadap strain-strain baru tetap perlu dilakukan untuk tujuan komersial.

Identifikasi gen *cry* pada strain *B. thuringiensis* merupakan hal yang penting. Banyak spesifisitas aksi dari toksin *Cry* yang sudah diketahui, oleh sebab itu sangat mungkin menyeleksi strain-strain alami atau lokal berdasarkan hal ini untuk digunakan sebagai pengendali beberapa target dan menyeleksi strain dengan aktivitas yang tinggi (Bravo *et al.*, 1998). Karena adanya distribusi gen-gen *cry* yang berbeda antar koleksi (Bravo *et al.*, 1998), perlu diketahui jenis gen *cry* pada TU1 yang diisolasi dari daerah di Sumatera Utara.

Amplifikasi gen *cry* dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk beberapa jenis gen *cryI* (Bravo *et al.*, 1998). Teramplifikasinya gen *cry* dengan besar pita yang sama di kedua isolat dan kenyataan bahwa kedua isolat memiliki spesifisitas insektisida yang mirip terhadap larva mengindikasikan bahwa kedua isolat memiliki gen *cry* yang sama yaitu kelompok gen *cryI*, meski belum tentu dari jenis gen *cryI* yang sama. Gen *cryI* merupakan salah satu gen *cry* yang umum ditemukan pada *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Schnepf *et al.*, 1998; Kuo dan Chak, 1996). Profil umum gen *cryI* yang ditemukan pada *B. thuringiensis* adalah jenis

*cryIA* (Bravo *et al.*, 1998; Cerón *et al.*, 1995). Informasi ini selanjutnya dapat digunakan untuk melihat apakah gen yang ada dalam isolat TU1 dari jenis gen *cryI* yang berbeda, dengan urutan sekuen nukleotida yang tidak sama atau jenis gen *cryI* yang sudah pernah diketahui sebelumnya.

Kedekatan mikroorganisme secara genetika saat ini dilakukan dengan beberapa metode molekuler seperti PFGE, amplifikasi PCR dan pengurutan gen rRNA sering digunakan. PFGE sudah digunakan misalnya untuk membedakan isolat klinis *B. cereus* (Liu *et al.*, 1997) dan *B. thuringiensis* (Rivera dan Priest, 2003). Pola pita PFGE yang dihasilkan setelah pemotongan DNA kromosom dengan enzim restriksi yang tepat merupakan suatu teknik yang pasti untuk dapat mengenali bakteri yang sangat dekat kekerabatannya.

Teknik PFGE digunakan untuk mengetahui kedekatan kekerabatan antara isolat TU1 dengan *B. thuringiensis* dari isolat komersial. Hasil menunjukkan bahwa kedua isolat, TU1 dan isolat komersial, memiliki kesamaan pola kromosom setelah pemotongan dengan enzim restriksi *SmaI*. Rivera dan Priest (2003) melihat pola yang sama dapat terjadi karena kesamaan gen *cry* yang dikandung bakteri *B. thuringiensis*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui proyek Hibah Pekerti. Ucapan terima kasih ditujukan kepada Laboratorium RCMD, Departemen Biologi Fakultas MIPA, IPB Bogor.

## KEPUSTAKAAN

- Agaisse H dan Lereclus D, 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 21: 6027–32.
- Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Ze'ev, Sinai R, Manasherob R, Khamraev A, Troitskaya E, Dubitsky A, Berezina N dan Margalith Y, 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4883–90.
- Ben-Dov E, Wang Q, Zaritzky A, Manasherob R, Barak Z, Schneider B, Khamraev A, Baizhanov M, Glupov V dan Margalith Y, 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3714–6.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Pen A G, Nunez-Valdez M-E, Soberon M dan Quintero R, 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965–72.
- Cerón J, Ortiz A, Quintero R, Güereca L, dan Bravo A, 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII*

- genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826–31.
- Itoua-Apoyolo C, Drif L, Vassal JM, Debarjac H, Bossy JP, Leclant F dan Frutos R, 1995. Isolation of Multiple Subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a Population of the European Sunflower Moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4343–7.
- Kawalek MD, Benjamin S, Lee HL dan Gill SS, 1995. Isolation and Identification of Novel Toxins from a New Mosquitocidal Isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2965–9.
- Kuo WS dan Chak KF, 1996. Identification of Novel *cry*-Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369–77.
- Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vliet A dan Peferoen M, 1996. A *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein with a High Activity against Members of the Family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80–6.
- Liu PYF, Ke SC dan Chen SL, 1997. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* 35: 133–1535.
- López-Meza JE dan Ibarra JE, 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1306–10.
- Rivera AMG dan Priest FG, 2003. Pulsed field gel electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates in general to crystal protein gene content. *FEMS Microbiol Lett.* 223: 61–6.
- Sambrook J, Fritsch EF dan Maniatis T, 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR dan Dean DH, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775–806.
- Smith RJ dan Cantor CR, 1987. Purification specific fragmentation and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol.* 155: 449–67.
- Suryanto D, dan Suwanto A, 2002. Effect of pH and NaCl concentration on benzoate utilization of anoxygenic photosynthetic bacteria. *J. Mikrobiol Indones.* 7: 15–8.
- Thomas DJI, Morgan JAW, Whipps JM, dan Saunders JR, 2000. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 118–24.
- Travers RS, Martin PAW, dan Reichelderfer CF, 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263–6.

Reviewer: **Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.**