

Eksplorasi Protein Toksin *Bacillus thuringiensis* dari Tanah di Kabupaten Tangerang

Sandra Hermanto^{1*}, Eddy Jusuf², M. Hero Shiddiqi¹

¹Program Studi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
Jl. Ir. H. Juanda No. 95 Ciputat 15412

²Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong - Bogor

e-mail : sandra.hermanto@gmail.com

Abstrak

Bacillus thuringiensis (Bt) merupakan bakteri gram positif berspora penghasil protein toksin yang bersifat sebagai insektisidal dan sitosidal. Tujuan dari penelitian ini adalah mengeksplorasi protein toksin yang dihasilkan dari isolat lokal *B.thuringiensis* hasil sampling di beberapa tempat di wilayah Kabupaten Tangerang dan memprediksi karakteristik protein tersebut berdasarkan bobot molekulnya. Beberapa wilayah yang dijadikan titik sampling antara lain : Ciherang, Ciputat, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Puspipstek, Pamulang, dan Cileduk. Isolasi *B.thuringiensis* dari sampel tanah dilakukan dengan metode Travera *et al.* (1987) menggunakan medium T3. Isolat yang diperoleh dikultivasi selama 72 jam pada suhu 28°C hingga sporulasi dan dihasilkan protein kristal yang kemudian ditentukan kandungan proteinnya dengan metode Lowry. Analisis profil protein dilakukan dengan SDS-PAGE pada konsentrasi *resolving gel* 12 % dan *stacking gel* 4 %. Dari hasil penelitian diperoleh 6 sampel tanah yang positif mengandung *B.thuringiensis*, yaitu sampel Ciherang, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Pamulang dan Cileduk. Analisis SDS-PAGE pada masing-masing sampel menunjukkan 5 jenis protein toksin yang diduga bersifat insektisidal, yaitu Cry 15, Cry 23, Cry 25, Cry 30, dan Cry 35, dan 3 jenis protein yang diprediksi bersifat sitosidal yaitu PS-2 (Cry 46), PS-3 (Cry41), dan PS-4 (Cry 45).

Kata Kunci: *Bacillus thuringiensis*, protein toksin, ICP, Parasporin, dan SDSPAGE

Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) is a gram-positive sporulated bacterium produces protein toxin as an insecticidal and sitosidal. The purpose of this study was to explore these protein toxin produced by local isolates isolated from several places in the district of Tangerang and predict the characteristics of these proteins based on molecular weight. Some areas are used as sampling points are: Ciherang, Chester, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Puspipstek, Pamulang, and Cileduk. *B.thuringiensis* were isolated by T3 medium. Cultivated isolates obtained during 72 hours at 28°C until sporulation and crystal protein is produced which is protein content then quantification by Lowry method. Protein profile analysis performed by SDS-PAGE which use 12% resolving gel concentration and 4% stacking gel. From the results obtained 6 positive samples of soil containing *B. thuringiensis*, i.e Ciherang, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Pamulang and Cileduk. SDS-PAGE analysis result showed five types of proteins are predicted to be insecticidal toxin, which is Cry 15, Cry 23, Cry 25, Cry 30 and Cry 35, and 3 types of proteins are predicted to be sitosidal the PS-2 (Cry 46), PS-3 (Cry41), and PS-4 (Cry 45).

Keywords: *B. thuringiensis*, toxinprotein, sporulation, SDSPAGE

1. PENDAHULUAN

Bacillus thuringiensis merupakan jenis bakteri gram positif yang terdiri dari sejumlah

besar subspecies atau varietas dan galur-galur (*strains*) yang ditemukan hampir di semua habitat. Bakteri ini pertama kali ditemukan

tahun 1901 oleh Ishiwata, yaitu peneliti Jepang pada ulat sutera (*Bombyx mori*) yang diketahui bersifat patogen terhadap serangga (Herlambang, 2007). Dilihat dari sifat morfologi maupun fisiologinya bakteri ini memiliki persamaan dengan *Bacillus cereus*, yang membedakan dengan *B.thuringiensis* adalah adanya kristal protein yang bersifat toksin terhadap serangga (Benhard *et al.*, 1993). Protein toksin ini pertama kali dikenal sebagai *parasporal crystalline inclusion* selanjutnya disebut sebagai δ -endotoksin atau *Insecticidal Crystal Protein* (ICP) yang dibagi dalam dua kategori protein, yaitu: protein Cry (*Crystal*) dan protein Cyt (dari kata *Cytolytic*) (Jusuf, 2009).

Sejak tahun 1930, ICP telah digunakan sebagai pestisida hayati (bioinsektisida) untuk menanggulangi serangga yang menjadi hama tanaman pertanian. *B. thuringiensis* dikenal sebagai agensia bahan baku pestisida yang baik dalam pertanian dan aman terhadap kesehatan serta ramah lingkungan. Sifat ramah lingkungan tersebut dikarenakan protein kristal yang diisolasi dari *B.thuringiensis* mempunyai target yang spesifik sehingga tidak mematikan serangga yang bukan sasaran dan mudah terurai, serta tidak menumpuk dan mencemari lingkungan.

Pada awal abad 21, diketahui juga bahwa beberapa tipe protein yang disintesis oleh *B. thuringiensis* memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan sel-sel kanker pada manusia. Yokohama *et al.* (1988) pertama kali melaporkan bahwa protein 25 kDa yang diisolasi dari *B. thuringiensis subs. israelensis* ONR-60A dapat menghambat tumbuh kultur sel leukemia tikus. Protein Cry anti kanker manusia dari galur *B. thuringiensis* disebut sebagai parasporin, diperkenalkan pertama kali oleh Mizuki *et al.* (2000). Istilah parasporin didefinisikan sebagai protein-protein δ -endotoksin yang non-hemolitik tetapi memiliki kemampuan preferensial membunuh sel kanker. Penemuan tersebut menjadi alternatif dalam menangani penyakit kanker. Pada dasarnya parasporin merupakan protein Cry juga seperti contoh protein PS-1 adalah Cry 31, PS-2 adalah Cry 46, PS-3 adalah Cry 41, dan PS-4 adalah Cry 45 (Ohba *et al.*, 2009).

Penyebaran bakteri ini sangat luas, didapatkan di tanah, pada makanan ternak, pada batang dan daun pepohonan dan lingkungan perairan (Martin dan Travers, 1989). Bangkai serangga merupakan sumber nutrisi yang memenuhi dalam kelangsungan hidup bakteri ini, dimana pada saat nutrisi akan habis maka *B. thuringiensis* akan membentuk spora dan mensintesis protein kristal toksik terhadap jenis serangga tertentu. Umumnya bangkai serangga terdapat pada tanah sehingga pada penelitian ini isolasi *B. thuringiensis* dilakukan pada tanah yang berasal dari Kabupaten Tangerang. Isolasi dimaksudkan untuk melengkapi informasi mengenai sebaran *B. thuringiensis* pada daerah tersebut.

Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi galur-galur lokal *B. thuringiensis* penghasil protein toksin yang berpotensi sebagai anti serangga dan anti kanker, kemudian mengidentifikasi tipe protein yang didapatkan berdasarkan bobot molekulnya. Identifikasi dilakukan dengan analisis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamid Gel Electroforesis*), di mana dari keseluruhan isolat yang diperoleh dibandingkan bobot molekulnya dan diharapkan mampu menghasilkan protein toksin sesuai dengan karakteristik bobot molekulnya.

2. METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain sampel tanah dari beberapa titik di Kabupaten Tangerang (Ciherang, Ciputat, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Puspipetek, Pamulang, dan Cileduk), galur *B. thuringiensis* pembanding (Isolat Cibinong 5k), triptosa, tripton, *yeast extract*, Natrium trifosfat, magnesium klorida, NaCl, HCl, EDTA, sukrosa, bromophenol blue, SDS, beta-merkaptotetanol, dithiothreitol, Akril/bis akrilamida (sigma), ammonium persulfat (sigma), *coomassie brilliant blue*, glisin, *resolving buffer* (1,5M Tris-HCl pH 8,8), *stacking buffer* (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), metanol, H₂SO₄, NH₄OH, Na₂CO₃,

CuSO₄.5H₂O, Natrium kalium tartrat, reagen folin, *N,N,N',N',tetramethylethylenediamine* (TEMED), BSA, standar protein catalog #161-0318 (Bio-Rad), dan aquades.

Alat yang digunakan terdiri dari erlenmeyer, vortex, timbangan digital (Sartorius), cawan petri, labu ukur, mikroskop, tabung reaksi, pH meter, Scanner Umax 5600, *mikrosentrifuge* (Sorval), mikropipet, autoklaf, *shaker incubator*, *laminar airflow*, spektrofotometer UV-VIS Lambda 25 Perkin Elmer, dan Mini-Protean Gel Electrophoresis (BIO-RAD).

Isolasi bakteri dari tanah (Travera *et.al.*, 1987)

Sampel tanah ditimbang (1g) dan dimasukkan ke dalam tabung 20 mL yang telah berisi 10 mL buffer fosfat 0,05 M dengan pH 6,8, dikocok dengan kuat selama 15 menit. Selanjutnya, dipanaskan pada suhu 70°C selama 30 menit dalam *waterbath*, lalu dikocok lagi dengan kuat untuk meratakan penyebaran spora selama 15 menit. Sebanyak 5 dan 10 µl suspensi disebarkan pada cawan petri yang berisi agar T-3 (3 g tripton, 2 g triptosa, 1,5 g *yeast extract*, 0,05 M Na₃PO₄, 0,005 M MnCl₂). Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama kurang lebih 48 jam, hingga muncul koloni yang memiliki kesamaan morfologi, warna, aroma yang sama dengan *B. thuringiensis* pembanding. Dari setiap sampel yang betul-betul mirip dengan *B. thuringiensis* pembanding, dipilih lalu ditransfer ke agar T-3 yang baru dan diinkubasi pada suhu 28°C hingga terjadi sporulasi selama ± 72 jam. Penapisan isolat dari koloni terpilih pada setiap sampelnya dilakukan dengan observasi mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya biasa dengan memastikan erbetuknya protein kristal. Pada observasi mikroskop, koloni dihomogenkan dengan menggunakan aquades steril pada kaca objek kemudian ditutup dengan kaca penutup yang sudah dilapisi dengan vaselin. Koloni yang dipastikan membentuk protein kristal dipanen dan dikoleksi sebagai isolat baru serta disimpan pada agar Luria-Bertani miring (per liter mengandung 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, 10

g NaCl dalam 15 g agar) dan diberi nomor isolat sesuai dengan asal sampel.

Isolasi Protein Toksin

Nomor-nomor isolat bakteri berkrystal ditumbuhkan pada media LB (Luria-Bertani) dalam cawan petri sebanyak 2 kali reinokulasi, kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Setelah itu koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan dalam plat agar 2xSG (per-liter mengandung 16 g *nutrient broth*, 2 g KCl, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 2 mL glukosa 50 %, 1 mL Ca(NO₃)₂ 1 M, 1 mL MnCl₂ 0,1 M, 1 mL FeSO₄ 1 mM dalam 17 g agar), kemudian diinkubasi hingga bersporulasi selama 48 - 72 jam. Koloni yang telah bersporulasi dipanen dan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL yang berisi 1 mL NaCl 0,5 M dingin, direndam dalam es dan dikocok hingga menjadi suspensi homogen. Suspensi disentrifugasi pada 13000g selama 10 menit, supernatan dibuang dan hanya disisakan pellet pada *microtube*. Pellet dicuci lagi dengan 1 mL NaCl 1% dan disentrifugasi kembali. Pellet yang diperoleh diresuspensi dengan 140 µl campuran 1% SDS-0,01 % β-merkaptotanol dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Suspensi kemudian disentrifugasi kembali pada 10000 g selama 10 menit untuk mendapatkan supernatant yang merupakan *crude extract* protein. Analisa kadar protein *crude extract* dilakukan dengan metode Lowry.

Kuantifikasi Kadar Protein (Metode Lowry, 1951)

Terhadap 400 µl sampel ditambahkan 400 µl *Lowry Concentrate 2x* yang berisi Reagen A (20 g Na₂CO₃ dalam 260 mL dH₂O, 0,4 CuSO₄.5H₂O dalam 20 mL H₂O dan Reagen B (0,2 g Na.K.tartrate dalam 20 mL H₂O, 4 g NaOH dalam 100 mL H₂O), campuran diinkubasi pada suhu ruang, ± 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 200 µl 0,2 N *Folin Ciocalteu*, lalu dihomogenkan dengan vortex setiap kali penambahan. Campuran diinkubasi 30 menit pada suhu ruang dan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm dengan menggunakan

larutan BSA (bovine serum albumin) sebagai pembanding.

Analisis Bobot Molekul Protein dengan SDS-PAGE

Elektroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate poliacrilamide gel electrophoresis*) dilakukan dengan menggunakan metode standar (Laemmli, 1970), menggunakan alat *Mini-Protean II Slab Cell Electrophoresis* (Bio Rad). Sampel protein (crude extract) didenaturasi dengan penambahan sample buffer (Tris-Cl 150mM pH 6.8, SDS 6.25%, β -merkaptoetanol, gliserol 25%, bromophenol blue 2,5 mM) dengan perbandingan protein dan buffer 2:1, dan dididihkan selama 10 menit serta disentrifugasi selama 5 menit. Alat elektroforesis disiapkan, Gel poliakrilamid dibuat dari larutan stok akrilamid & bisakrilamid (30%T, 2,67C), stacking buffer (Tris-HCl 0,5M pH 6.8), resolving buffer (Tris-HCl 1,5M pH 8.8), 10%SDS, APS dan TEMED sebagai katalis. Setelah gel bagian bawah (*resolving gel*) terbentuk, stacking gel dimasukkan di bagian atasnya dan dibuat cetakan untuk menempatkan protein sampel. Formulasi gel untuk resolving gel adalah 12% sedangkan untuk stacking gel adalah 4%. Elektroforesis sampel dilakukan pada tegangan 150 volt selama 60 menit berikut protein marker sebagai pembanding. Untuk staining protein digunakan *Coomasie brilliant blue* 0.1% (w/v). Hasil staining dicuci dalam larutan metanol : asam asetat (40%:7.5%). Protein yang telah didestaining difoto dengan kamera digital, untuk analisa lebih lanjut.

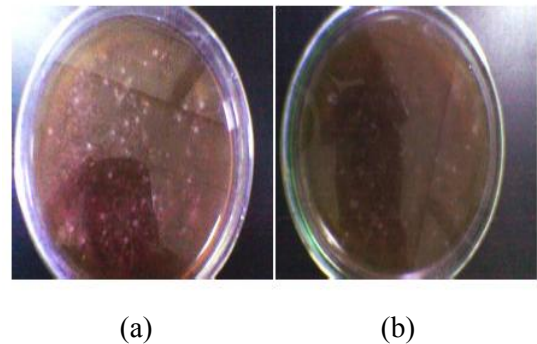
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Isolat *B.thuringiensis* dari sampel tanah di Kabupaten Tangerang

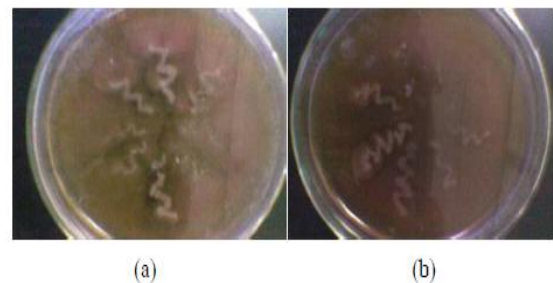
Hasil isolasi yang dilakukan terhadap beberapa sampel tanah di Kabupaten Tangerang menunjukkan 6 sampel yang diduga memiliki kemiripan dengan koloni *B. thuringiensis*, yakni sampel Ciherang, Pasar Kemis, Kosambi, Parung Secab, Pamulang dan Ciledug. Kemiripan tersebut terlihat dari koloni yang tumbuh memiliki permukaan yang

kasar, agak mengkilat, dan warna koloni putih kekuningan seperti terlihat pada Gambar 1.

Koloni-koloni dari sampel yang memiliki kesamaan dengan koloni *B. thuringiensis* pembanding, selanjutnya diseleksi kembali sehingga diperoleh 24 koloni seperti yang terlihat pada Gambar 2.

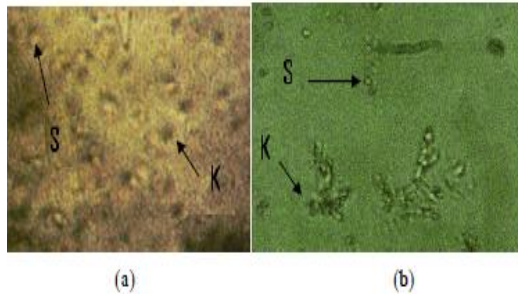


Gambar 1. Isolat (a) *B.thuringiensis* pembanding dan (b) Isolat Pasar Kemis.



Gambar 2. Isolat 24 koloni terpilih: (a) Isolat Ciherang dan (b) Isolat Pamulang.

Pemilihan 24 koloni tersebut dimaksudkan untuk menyeleksi kembali isolat-isolat yang memiliki kemiripan dengan *B. thuringiensis* hasil pengujian lebih lanjut menggunakan mikroskop. Dari pemilihan koloni-koloni tersebut terpilihlah beberapa koloni yang mampu menghasilkan protein kristal yang merupakan ciri dari *B.thuringiensis*. Adapun hasil pengujian mikroskopis pada salah satu koloni sampel terlihat seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji mikroskop : (a) isolate Kem7, salah satu isolat yang menghasilkan protein kristal. (b). Isolat *B. thuringiensis* pembanding. Keterangan: S = spora dan K =protein kristal.

Hasil penapisan 24 koloni terpilih dengan menggunakan mikroskop didapatkan 30 nomor isolat yang menghasilkan protein kristal. Isolat-isolat dari tanah yang dipastikan membentuk protein kristal antara lain, terlihat pada Tabel 1.

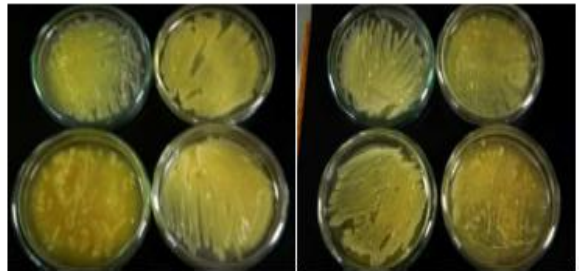
Tabel 1. Isolat sampel tanah yang menghasilkan protein kristal

Sampel Tanah	Isolat Penghasil Protein Kristal
Ciherang (Ch)	Ch-3 dan Ch 7
Parung (Par)	Par 8, Par 9, Par 11, Par 16, Par 17, dan Par 18
Pamulang (Pm)	Pm 6, Pm 10, Pm14, Pm 19, dan Pm 23
Cileduk (Cdk)	Cdk 3, Cdk 4, Cdk 9, dan Cdk 14
Kosambi (Kos)	Kos 6, Kos 7, Kos 9, Kos 15 dan Kos 16
Pasar Kemis (Kem)	Kem 3, Kem 5, Kem 6, Kem 7, Kem10, Kem 22, Kem 23 dan Kem 24

Sampel tanah dari Pasar Kemis memiliki isolat terbanyak dan Ciherang memiliki isolat terkecil sebagai penghasil protein kristal. Hal ini menandakan pada sampel tanah yang diambil dari Pasar Kemis memiliki sumber mineral, karbon, dan nitrogen yang cukup banyak bagi pertumbuhan *B. thuringiensis* disamping kondisi lingkungan seperti pH, kelarutan oksigen dan temperatur yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri tersebut.

Isolasi Protein Toksin

Terhadap isolat sampel tanah yang menghasilkan protein kristal selanjutnya dilakukan peremajaan dalam medium Luria Bertani (LB) dimana medium LB merupakan medium yang kaya akan kandungan karbon, nitrogen dan mineral yang cukup bagi kelangsungan hidup *B. thuringiensis*. Peremajaan tersebut dimaksudkan agar bakteri dapat lebih produktif dalam menghasilkan protein kristal saat di medium sporulasi. Koloni hasil dari peremajaan dipindahkan pada medium 2xSG agar bakteri bersporulasi sehingga dihasilkan protein kristal. Penggunaan medium 2xSG dilakukan karena kandungan karbon, nitrogen dan mineral yang relative sedikit sehingga memungkinkan *B. thuringiensis* untuk bersporulasi. Isolat bakteri hasil peremajaan yang ditumbuhkan pada medium 2xSG terlihat seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Isolat bakteri hasil peremajaan yang ditumbuhkan dalam medium 2xSG

Hasil inokulasi pada medium 2xSG yang sudah mengalami sporulasi, dipanen dan dibersihkan dengan NaCl 1% untuk menghilangkan medium yang terbawa pada spora dan kristal saat proses pemanenan. Pemisahan spora dan protein kristal dilakukan dengan menambahkan campuran SDS 1%- β -merkaptotanol 0,01%, dimana protein kristal yang bercampur dengan spora akan terpisahkan karena β -merkaptotanol berfungsi sebagai reduktor yang akan mereduksi dinding sel bakteri dan larutan SDS yang akan mendegradasi komponen kimiawi membran sel sehingga protein kristal yang telah terpisah akan terlarut. Protein Kristal yang telah terisolasi kemudian ditentukan kadar proteinnya dengan metode Lowry.

Sampel yang diujikan sebanyak 30 sampel protein kristal, yaitu Ch-3, Ch 7, Par 8, Par 9, Par 11, Par 16, Par 17, Par 18, Pm 6, Pm 10, Pm 14, Pm 19, Pm 23, Cdk 3, Cdk 4, Cdk 9, Cdk 14, Kos 6, Kos 7, Kos 9, Kos 15, Kos 16, Kem 3, Kem 5, Kem 6, Kem 7, Kem10, Kem 22, Kem 23, dan Kem 24. Sedangkan standar pembanding yang digunakan adalah BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan konsentrasi 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Dari hasil pengujian intensitas warna kompleks yang dihasilkan sampel protein kristal diperoleh konsentrasi protein sampel sebagaimana terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengukuran konsentrasi sampel protein kristal

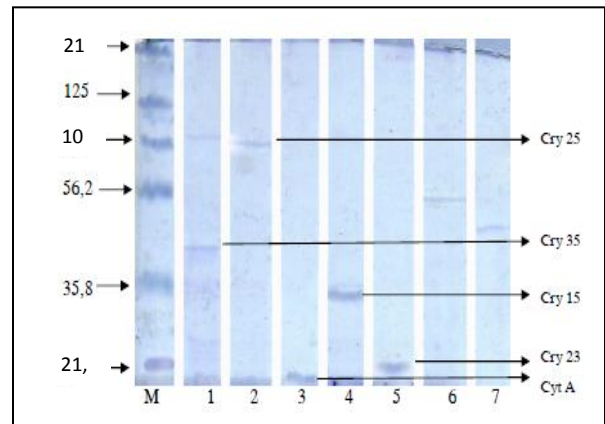
Sampel	Absorbansi	Konsentrasi Protein (ppm)
Ch 3	0,402	56,71
Ch 7	0,449	63,43
Par 8	0,522	73,86
Par 9	0,158	43,71
Par 11	0,158	43,71
Par 16	0,380	53,57
Par 17	0,453	64,00
Par 18	0,710	99,28
Pm 6	0,376	53,00
Pm 10	0,483	68,29
Pm 14	0,662	93,86
Pm 19	0,517	73,14
Pm 23	0,112	30,57
Cdk 3	0,698	99,00
Cdk 4	0,383	54,10
Cdk 9	0,528	74,71
Kos 6	0,57	80,72
Kos 7	0,495	70,03
Kos 9	0,532	75,28
Kem 3	0,453	64,00
Kem 5	0,233	32,57
Kem 6	0,374	52,71
Kem 7	0,481	68,02
Kem 22	0,443	62,517
Kem 23	0,436	61,571

Dari hasil pengujian kadar protein (Tabel 2), diperoleh konsentrasi terbesar pada sampel Cdk 3 yaitu 99 ppm, dengan absorbansi sebesar 0,698. Sedangkan konsentrasi terkecil terdapat pada sampel Pm 23 yaitu 30,571 ppm, dengan absorbansi sebesar 0,112. Perbedaan kadar protein pada masing-masing sampel

dapat disebabkan dari berbedanya jumlah biomassa isolat yang didapat dan dipengaruhi oleh proses sporulasi dari isolat pada masing-masing sampel dalam menghasilkan protein toksin.

Profil Protein hasil analisis SDS-PAGE

Analisa SDS-PAGE dilakukan untuk mengestimasi bobot molekul protein sampel yang didapat dari hasil isolasi *B. thuringiensis* pada tanah di kabupaten Tangerang. Kemudian mencocokkan hasil bobot molekul yang didapat dengan sumber referensi untuk memprediksi jenis protein toksin yang didapat. Adapun hasil-hasil analisa SDS-PAGE yang dilakukan pada setiap sampel disajikan pada gambar berikut :



Gambar 5. Hasil analisa SDS-PAGE pada sampel protein 1 (Kos 6), 2 (Kem23), (Par 17), 4 (Kos 9), 5 (Kos 7), 6 (Par 8), dan 7 (Pm 14).

Hasil analisis SDS-PAGE untuk ke-24 isolat protein toksin yang diperoleh dari masing-masing sampel dianalisis bobot molekulnya melalui persamaan regresi linier dengan membandingkan jarak migrasi dari pita-pita protein yang dihasilkan sebagai fungsi log BM dari representasi protein standar (BIO-RAD). Hasil prediksi protein toksin dari masing-masing sampel berdasarkan karakteristik bobot-molekulnya terlihat seperti pada Tabel 3.

Dari data tersebut dapat terlihat 20 sampel protein toksin yang diduga terdiri dari 14 protein Cry dan 6 protein Cyt, sedangkan 10 sampel protein lainnya belum dapat diprediksi

jenis protein toksinnya. Protein Cyt yang diprediksi didapat hanya 1 tipe yang terdiri dari 5 sampel protein yaitu Cyt A. Terdapat 5 tipe protein toksin yang diprediksi bersifat insektisidal atau lebih dikenal dengan ICP (*Insecticidal Crystal Protein*) yang terdiri dari 10 sampel protein, antara lain Cry 15, Cry 23, Cry 25, Cry 30, dan Cry 35. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya dimana, protein Cry 15 memiliki sifat toksin terhadap serangga ordo lepidoptera (Brown dan Whiteley, 1992).

Tabel 3. Bobot molekul protein isolat *B. thuringiensis* local dan prediksi protein toksinnya.

Sampel	Bobot molekul (kDa)	Jenis Protein toksin (prediksi)*
Cdk 3	29	Cry 23
Cdk 4	29	Cry 23
Cdk 9	29	Cry 23
Cdk 14	28	Cyt A
Ch 3	27	Cyt A
Ch 7	27	Cyt A
Kem 3	49	-
Kem 5	35	Cry 30
Kem 7	31	Cry 45
Kem 22	88	Cry 41
Kem 23	100	Cry 25
Kos 6	44	Cry 35
Kos 7	29	Cry 23
Kos 9	34	Cry 15
Kos 16	28	Cyt A
Par 9	31	Cry 45
Par 11	33	Cry 46
Par 16	35	Cry 30
Par 17	28	Cyt A
Par 18	44	Cry 35
Pm 23	31	Cry 45

* Arrieta *et al.*, 2004, Brown & Whiteley, 1992, Zeigler, 1999, Ernest *et al.*, 2005, Hofte dan Whiteley, 1989, Hayakawa *et al.* 2007, Kitada *et al.*, 2005

Protein Cry 23 memiliki sifat toksin terhadap serangga ordo diptera (Arrieta *et al.*, 2004), protein Cry 25 memiliki sifat toksin terhadap serangga ordo coleoptera, protein Cry 30 memiliki sifat toksin terhadap serangga ordo dipteral (Zeigler, 1999), dan protein Cry 35 memiliki sifat toksin terhadap serangga ordo diptera (Ernest *et al.*, 2005).

Protein Cyt A yang dihasilkan oleh *B.thuringiensis* memiliki bobot molekul 27

kDa (Balaraman *et al.*, 2005) dan 28 kDa (Hofte dan Whiteley, 1989). Sampel protein Ch 3 dan Ch 7 memiliki bobot molekul sebesar 27 kDa, serta sampel protein toksin Par 17, Kos 16, dan Cdk 14 memiliki bobot molekul sebesar 28 kDa. Sehingga diprediksi sampel protein Ch 3, Ch 7, Par 17, Kos 16 dan Cdk 14 merupakan protein Cyt A. Pada penelitian yang dilakukan Arrieta *et al.* (2004), protein toksin yang dihasilkan oleh *B.thuringiensis* dengan bobot molekul 29 kDa digolongkan sebagai protein Cry 23. Sampel protein Kos 7, Cdk 3, Cdk, 4, dan Cdk 9 memiliki bobot molekul sebesar 29 kDa, sehingga diprediksi merupakan protein Cry 23.

Sampel protein Kos 9 dengan bobot molekul sebesar 34 kDa diprediksi sebagai protein Cry 15, hal ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan Brown dan Whiteley (1992) pada *B.thuringiensis subs thompsoni* bahwa protein Cry dengan bobot molekul 34 kDa digolongkan sebagai protein Cry 15. Zeigler (1999) menyatakan dalam *Bacillus Genetic Stock Center of Strains, Part 2; Bacillus thuringiensis dan Bacillus cereus*, protein Cry dengan bobot molekul 35 kDa digolongkan sebagai protein Cry 30 dan protein Cry dengan bobot molekul 100 kDa digolongkan sebagai Cry 25. Protein sampel Par 16 dan Kem 5 memiliki bobot molekul sebesar 35 kDa sehingga diprediksi merupakan protein Cry 30, sedangkan sampel protein Kem 23 memiliki bobot molekul 100 kDa diprediksi merupakan protein Cry 25. Ernest *et al.* (2005), melakukan karakterisasi terhadap protein Cry 35 dan didapat bobot molekul sebesar 44 kDa. Sampel protein Par 18 dan Kos 6 memiliki bobot molekul sebesar 44 kDa sehingga diprediksi merupakan protein Cry 35.

Hayakawa *et al.* (2007) menggolongkan protein kristal dengan bobot molekul $\pm 33,107$ kDa merupakan PS2 (Cry 46) yang diperoleh dari galur *B.thuringiensis* TK-E6. Sampel protein Par 11 memiliki bobot molekul 33 kDa, sehingga diprediksi sebagai PS 2 (Cry 46). Sampel protein Kem 22 dengan bobot molekul 88 kDa diprediksi sebagai PS 3 (Cry 41), sedangkan Pm 23, Par 9 dan Kem 7 dengan bobot molekul 31 kDa diprediksi sebagai PS 4 (Cry 45). Hal ini didasarkan pada penelitian Kitada *et al.* (2005) yang mengidentifikasi

parasporin dan sel kanker sarannya, parasporin dengan bobot molekul 88 kDa digolongkan sebagai PS 3 (Cry 41) dan parasporin dengan bobot molekul 31 kDa digolongkan sebagai PS 4 (Cry45).

Berdasarkan hasil analisis bobot molekul yang dilakukan dengan SDS-PAGE (gambar 5), terlihat bahwa dari beberapa isolat *B.t* local yang menghasilkan protein toksin, memiliki karakteristik bobot molekul yang diduga berpotensi sebagai agen insektisidal dan sitosidal. Namun demikian untuk mengkonfirmasi hal tersebut, perlu dilakukan pengujian bioaktivitas protein lebih lanjut melalui analisis *in vitro* dan perlu ditunjang dengan analisis sekuen 16SrDNA untuk menyatakan bahwa isolat yang dihasilkan adalah betul-betul merupakan *Bacillus thuringiensis*.

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Terdapat 24 isolat yang diduga merupakan isolat *B.thuringiensis* yang telah berhasil diisolasi dari 6 sampel tanah yang berada di Wilayah Kabupaten Tangerang.
2. Semua isolat *B.thuringiensis* tersebut diprediksi menghasilkan 8 tipe protein Cry dan 1 protein Cyt dengan bobot molekul 27 dan 28 kDa (Cyt A), 29 kDa (Cry 23), 31 kDa (Cry 45/ PS-4), 33 kDa (Cry 46/ PS-2), 34 kDa (Cry 15), 35 kDa (Cry 30), 44 kDa (Cry 35), 88 kDa (Cry 41/ PS-3), dan 100 kDa (Cry 25).

Daftar Pustaka

- Arrieta, G, Hernández A. & Ana M. Espinoza 2004. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Coffee Plantations Infested with the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Jurnal Biol. Trop.*, Edisi 52 (3), h. 757-764.
- Laemmli UK., 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227** (5259): 680–685.
- Balaraman, K. 2005. Occurrence and Diversity of Mosquitocidal Strains of *Bacillus thuringiensis*. *Jurnal Vect Borne*, Edisi No. 42, h. 81-86.
- Bernhard, K. dan Urtz, R. 1993 *Production of Bacillus thuringiensis for Experiment and Commercial Use in Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. (Enwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J. & Higgs S. eds.). Bristol: John Walley & Sons.
- Brown, K. L., dan H. R. Whiteley. 1992. Molecular Characterization of Two Novel Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Thompsoni*. *Jurnal Bacteriol*, Edisi No. 174, h. 549–557
- Ernest, S. H 2005. Characterization of Cry 34/35 Binary Insecticidal Protein from Diverse *Bacillus thuringiensis* Strain Collections. *Jurnal Enviromental Microbiology*, Vol. 71, No.4.
- Hayakawa, T., dan Kanagawa, R. 2007. Parasporin 2Ab, a Newly Isolated Cytotoxic Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Jurnal Microbiol*, Edisi No. 55, h. 78-83.
- Herlambang, W. 2007. Profil Plasmid *Bacillus thuringiensis* Isolat Jakarta, Bogor, Depok, Tangerang, dan Bekasi. *Skripsi Jurusan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor*.
- Hofte H. dan Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Jurnal Microbial*, Edisi No. 53(2), h. 245-255.
- Jusuf, E. 2009. Exploration of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoksin Protein Distributed Around Jabodetabek Region. *J. Microbiology Indonesia*. Vol. 3(2), h. 51-55.
- Kitada, S. Abe, Y. Ito, A. Kuge, O. Akao, T. Mizuki, E. Ohba, M. 2005. Molecular Identification and Cytocidal Action of Parasporin a Protein Group of Novel Crystal Toxins Targetting Human Cancer Cells. *Conferense on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Enviromental Impact*, h. 23-27.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1): 265–75.

- Martin, P. A. W dan Travers, R. S. 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 55, No. 10.
- Mizuki, E. , Park Y.S., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K, Ohba M.,2000. Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 7, No.4.
- Ohba, M., Mizuki, E., Uemori, A. 2009. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. Anti Cancer Research Vol. 29, h. 427-434.
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (September 1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." *Biochem Biophys Res Commun.* **28** (5): 815–820.
- Travera MS, Martin PAW, Reichelderfer CF.1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* sp. J. Environ.Microbiol. Edisi No.53, h.1263-1266.
- Yokohama, Y. 1988 Potentiation of The Cytotoxic Activity of Anti-Cancer Drugs Against Cultured L1210 Cells by *Bacillus thuringiensis* Subsp isrelensis Toxin. J. Chem. Pharm. Bull. 36 (11) : 4499 – 4504.
- Zeigler, D. R. 1999. *Bacillus Genetic Stock Center of Strains, Part 2; Bacillus thuringiensis dan Bacillus cereus*. USA: The Ohio State University.