

# Ekstraksi DNA *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal yang Mengandung Gen *Cry1* untuk Pembuatan Pustaka Plasmid *Bt*

Habib Rijzaani dan Bahagiawati

*Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian*

## ABSTRAK

Usaha kloning gen *cry1* dari isolat *Bacillus thuringiensis* lokal telah dilakukan dengan menapis menggunakan PCR. Telah diidentifikasi 11 isolat *B. thuringiensis* lokal yang mengandung gen *cry1* berdasarkan penggandaan DNA plasmid dengan primer spesifik untuk gen *cry1A*. Hanya lima dari kesebelas isolat ini yang memiliki satu pita PCR berukuran 490 pb sebagaimana kontrol positif Dipel<sup>®</sup>. Plasmid yang mengandung sekuens gen ini, dari isolat terpilih Jtg2151, telah diisolasi dan dipotong dengan enzim restriksi. Berdasarkan ukuran DNA plasmid yang terpotong, enzim restriksi *EcoRI*, *HindIII*, dan *PstI* akan dipakai untuk pembuatan pustaka plasmid *B. thuringiensis*.

**Kata kunci:** Gen *cry1A*, *Bacillus thuringiensis*, kloning

## ABSTRACT

An effort to clone *cry1* gene from local isolates of *Bacillus thuringiensis* had been initiated by screening using PCR. Eleven local isolates of *B. thuringiensis* were identified possessing *cry1* gene based on the amplification of plasmid DNA using primers specific for *cry1A* genes. Only five from these eleven isolates produced one 490 bp band like the positive control, Dipel<sup>®</sup>. DNA plasmid that contains this gene sequence, from chosen isolate Jtg2151, had been isolated and digested with restriction enzymes. Based on the size of the DNA fragments produced, restriction enzymes *EcoRI*, *HindIII*, and *PstI* will be used to generate plasmid library of *B. thuringiensis*.

**Key words:** *Cry1A* gene, *Bacillus thuringiensis*, cloning

## PENDAHULUAN

Kerugian yang disebabkan oleh hama dan penyakit tanaman diperkirakan dapat mengurangi total produksi pertanian hingga 37%, 13% di antaranya adalah karena serangan hama. Di Amerika Serikat kerugian yang disebabkan oleh serangan hama dapat mencapai 7,7 miliar dolar per tahun atau 61,6 triliun rupiah per tahun (Bent dan Yu, 1999).

Teknologi yang sampai saat ini sering dipakai untuk mengendalikan hama adalah pemakaian insektisida. Teknologi ini merupakan teknologi yang populer karena efeknya dapat dilihat dalam waktu singkat setelah aplikasi dan kemudahan dalam mendapatkannya. Sayangnya teknologi ini relatif mahal, terutama bagi para petani di negara yang sedang berkembang. Di

samping itu, teknologi insektisida ini cukup berbahaya bagi manusia, hewan, dan spesies bukan sasaran serta lingkungan, jika dilakukan dengan prosedur yang kurang tepat.

Teknologi lain yang dapat digunakan untuk pengendalian hama adalah pemakaian varietas tahan. Penggunaan varietas tahan ini telah menunjukkan keefektifannya di dunia, termasuk di Indonesia, di mana VUTW cukup sukses dalam mengendalikan hama wereng coklat (Oka dan Bahagiawati, 1984). Namun demikian, tidak tersedia varietas tahan untuk berbagai jenis hama. Walaupun ada, jumlahnya sangat terbatas. Perkembangan teknologi DNA rekombinan telah memungkinkan perakitan tanaman tahan hama dengan teknologi rekayasa genetika.

Dikarenakan oleh adanya kekhawatiran akan pengaruh negatif pemakaian pestisida sintetis, maka masyarakat mengalihkan perhatiannya kepada bioinsektisida sebagai teknologi alternatif untuk menurunkan populasi hama. *Bacillus thuringiensis* (Bt), merupakan famili bakteri yang memproduksi kristal protein di *inclusion body*-nya pada saat ia bersporulasi (Höfte dan Whiteley, 1989). Bioinsektisida Bt merupakan 90-95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk dipakai oleh petani di berbagai negara (Feitelson *et al.*, 1993). Salah satu kelemahan pemakaian bioinsektisida Bt adalah kepekaan bioinsektisida ini terhadap sinar ultra violet, sehingga keefektifannya di lapang tidak bertahan lama (Dent, 1993). Di samping itu, bioinsektisida ini tidak dapat dipakai pada beberapa jenis hama yang hidup di dalam jaringan tanaman karena tidak dapat dijangkau oleh bioinsektisida yang digunakan. Contohnya adalah hama penggerek batang jagung dan padi. Dengan kemajuan teknologi, gen insektisida Bt ini telah dapat diisolasi dan diklon sehingga membuka kemungkinan untuk diintroduksikan ke dalam tanaman (Adang *et al.*, 1993).

Tanaman yang mengekspresikan gen Bt ini dikenal dengan sebutan tanaman transgenik Bt. Tanaman transgenik Bt pertama kali dikomersialkan pada tahun 1995/96 dan sejak itu luas pertanaman tanaman ini selalu meningkat (James, 1998). Tanaman transgenik Bt ini dapat mengatasi kelemahan yang dimiliki oleh bioinsektisida Bt karena faktor kepekaannya terhadap sinar UV dapat dihilangkan. Di samping itu, gen Bt ini terekspresi di dalam jaringan tanaman sehingga tanaman transgenik ini diharapkan dapat menghambat hama yang memakan jaringan tanaman tersebut.

Langkah awal dari usaha transformasi tanaman dengan gen Bt ini adalah mengkloning gen Bt ke dalam vektor yang sesuai. Pada saat ini semua usaha transformasi tanaman dengan gen Bt di Indonesia memakai gen Bt yang berasal dari luar negeri yang umumnya telah dipatenkan. Sehingga penggunaan gen ini di Indonesia hanya terbatas untuk penelitian saja. Karena tujuan akhir dari transformasi adalah untuk melepaskan tanaman rakitan dan komersialisasinya, maka sangat diperlukan ketersediaan gen Bt yang dibuat sendiri sehingga kita bebas mempergunakannya sesuai dengan keperluan kita.

Penelitian ini merupakan penelitian jangka panjang, yaitu lebih kurang lima tahunan. Penelitian jangka panjang ini dimulai dengan isolasi isolat Bt, identifikasi keberadaan gen *cry* pada isolat-isolat tersebut dengan teknik PCR, dan konfirmasi virulensi isolat tersebut terhadap hama tanaman. Setelah itu, baru dimulai kloning gen *cry*. Kloning ini dimulai dengan mengisolasi DNA dari isolat yang mengandung gen *cry* dan toksik. Selanjutnya DNA ini dipakai untuk pembuatan pustaka plasmid Bt. ROPP ini bertujuan untuk mengisolasi DNA Bt bagi pembuatan pustaka plasmid tersebut.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Perbanyak Isolat *B. thuringiensis***

Isolat-isolat *B. thuringiensis* yang akan dipakai dalam proses PCR ditumbuh-kan sebagai koloni tunggal dari stok agar miring pada petri agar LB. Setelah semalam pada suhu 28°C *master plate* ini diparafilm dan disimpan pada suhu -4°C. Dari koloni-koloni tunggal yang terbentuk, satu ose dipakai untuk menginokulasi 3 ml LB cair. Setelah semalam diinkubasi pada suhu kamar, kultur cair yang diperoleh digunakan sebagai bahan untuk mengisolasi DNA plasmid.

### **Isolasi DNA Plasmid *B. thuringiensis***

DNA plasmid dari isolat *B. thuringiensis* yang diuji diisolasi dengan metode Birnboin (Ausubel *et al.*, 1992). Dari 3 ml kultur bakteri dituangkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml dan sel-selnya diendapkan dengan sentrifugasi selama 1 menit. Endapan sel dibersihkan dari media LB dengan membuang supernatannya. Sebanyak 100 µl GTE (50 mM glukosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, dan 10 mM EDTA pH 8) ditambahkan ke dalam endapan sel ini dan disuspensikan. Setelah 5 menit dalam suhu kamar, 200 µl larutan lisis (0,2 M NaOH dan 1% SDS) ditambahkan dan campuran dikocok perlahan. Setelah 5 menit dalam es, 150 µl potasium asetat 3 M dingin ditambahkan, campuran divorteks dan dimasukkan kembali dalam es selama 5 menit. Setelah sentrifugasi selama 2 menit, supernatan dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambahkan 0,6 volume isopropanol. DNA plasmid diendapkan setelah 5 menit dalam suhu kamar melalui sentrifugasi selama 2 menit. Endapan DNA plasmid dicuci dua kali dengan etanol 70%, dikeringanginkan dan dilarutkan dalam 30 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8 dan 1 mM EDTA).

Kualitas DNA plasmid yang diperoleh dicek dengan mengelektroforesis 5 µl DNA pada 0,8% gel agarosa TBE 0,5x. Sementara kuantitas DNA yang diperoleh di-perkirakan dengan spektrofotometer pada gelombang 260 nm. Konsentrasi DNA = serapan pada 260 nm x faktor pengenceran x 50 µg/1000 µl (Davis *et al.*, 1994; Boomer, 2001).

### **Penapisan Isolat *B. thuringiensis* yang Mengandung Gen *cry1* melalui PCR**

Amplifikasi DNA plasmid *B. thuringiensis* dengan teknik PCR dilakukan berdasarkan metode Carozzi *et al.* (1991) yang dimodifikasi, yaitu hanya menggunakan 1 pasang primer dari 6 pasang primer. Setiap reaksi amplifikasi dengan volume 25 µl terdiri dari 5 µl DNA (50 ng/µl) sebagai cetakan; 2,5 µl thermophilic DNA polymerase 10 x bufer PCR dengan MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µl PCR nucleotide mix; 0,25 µl 5 unit/µl enzim *Taq* DNA polymerase; 1 µl (5 pmol) primer Lep1A (5'CCGGTGCTG GATTTGTGTTA3'); 1 µl (5 pmol) primer Lep1B (5'AATCCCGTATTGTACCAGCG3'); dan 14,75 µl ddH<sub>2</sub>O. Campuran reaksi tersebut selanjutnya diinkubasi dalam es sebelum dimasukkan ke mesin PCR yang telah dipanaskan. Amplifikasi menggunakan mesin PCR PTC-100 (MJ Research) yang diprogram untuk melakukan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* (pelekatan) pada suhu 45°C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Reaksi diakhiri dengan elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit, kemudian penurunan suhu menjadi 4°C untuk menghentikan reaksi.

Fragmen DNA hasil amplifikasi dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5% (b/v). Sebanyak 12,5 µl produk PCR ditambah dengan 2 µl *blue juice* (*loading buffer*) dan dihomogenkan menggunakan ujung pipet. Campuran reaksi kemudian dimasukkan ke dalam sumur dari gel agarosa 1,5% (b/v) yang telah direndam dengan bufer TBE 0,5x. Aparatus elektroforesis dihubungkan dengan tegangan listrik 80 volt selama 90 menit, selanjutnya dideteksi dengan perendaman etidium bromida (1 µg/ml) selama 10-15 menit, dan difoto dengan kamera Polaroid.

### **Pemotongan DNA Plasmid untuk Kloning**

Sebanyak 10 µl DNA plasmid dipakai dalam reaksi pemotongan dengan beberapa enzim restriksi *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, dan *Sma*I. Reaksi pemotongan mengikuti petunjuk dari pembuat enzim. Setelah diinkubasi dalam suhu 37°C selama 2-4 jam, hasil pemotongan dicek melalui elektroforesis agarose 0,8% (dalam 0,5x TBE buffer, 3V/cm selama 1 jam). Dari hasil pemotongan ini akan ditentukan enzim mana yang cocok dipakai dalam proses kloning. Vektor kloning plasmid *pGEM7Zf* dari Promega akan dipotong dengan enzim serupa dan akan diligasikan dengan hasil pemotongan DNA plasmid dari isolat-isolat *B. thuringiensis* terpilih (yang mengandung gen *cry*1 dan toksik).

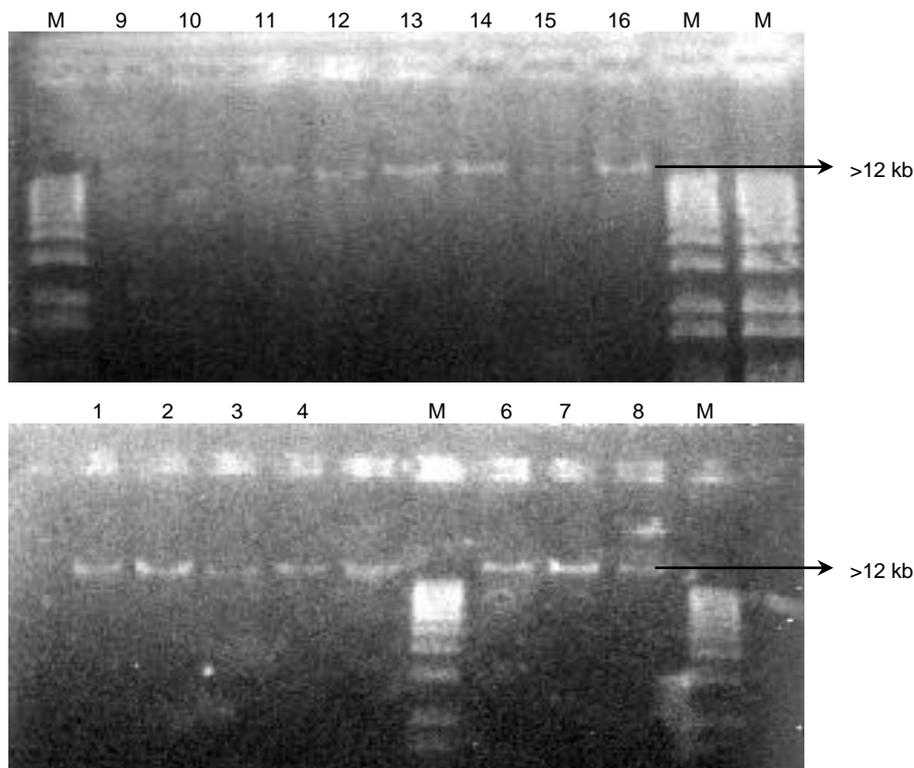
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Perbanyak Isolat *B. thuringiensis***

Isolat *B. thuringiensis* yang akan diuji berhasil ditumbuhkan dalam bentuk *master plate* yang berisi koloni tunggal. Koloni-koloni ini digunakan sebagai sumber isolat bagi pengujian selanjutnya.

### Isolasi DNA Plasmid *B. thuringiensis*

Pengamatan hasil elektroforesis plasmid *B. thuringiensis* menunjukkan bahwa seluruh isolat menghasilkan DNA plasmid. Seluruh isolat *B. thuringiensis* menghasilkan pola pita DNA plasmid dengan ukuran yang serupa sebesar lebih dari 12 kb (ukuran terbesar dari penanda bobot molekul, Gambar 1). Ukuran sebenarnya dari plasmid ini belum dapat ditentukan melalui gel agarose elektroforesis karena tidak adanya penanda berat molekul yang sesuai. Dalam beberapa isolat dapat dilihat adanya pita DNA samar yang berukuran lebih besar. Pita DNA ini dapat berarti adanya plasmid yang berukuran lebih besar atau plasmid yang sama yang telah terpotong menjadi linear akibat proses isolasi DNA plasmid. Bila kemungkinan kedua yang benar maka ukuran plasmid sebenarnya jauh lebih besar daripada 12 kb. Penelitian yang dilakukan oleh Lereclus *et al.* pada tahun 1982 (Lereclus *et al.*, 1993), menunjukkan bahwa terdapat dua ukuran plasmid *B. thuringiensis*, yaitu plasmid berukuran kecil (<15 kb) dan plasmid berukuran besar (>45 kb). Fungsi plasmid berukuran kecil belum diketahui sedangkan plasmid berukuran besar merupakan plasmid yang membawa gen pengkode protein kristal. Penelitian yang dilakukan González *et al.* (1981), menunjukkan bahwa *B. thuringiensis* yang kehilangan plasmid berukuran besar akan kehilangan kemampuannya untuk menghasilkan protein kristal.



Semua isolat memiliki satu pita DNA terang dengan ukuran lebih dari 12 kb. 1 = Cib451, 2 = Lam864, 3 = Jtm1842, 4 = Jtg2151, 5 = Lam861, 6 = C423, 7 = C522, 8 = G631, 9 = C432, 10 = Ser455, 11 = Ser554, 12 = C512, 13 = C531, 14 = Cib361, 15 = Lam854, 16 = kontrol positif (Dipel<sup>®</sup>), M = penanda bobot molekul 1 Kb DNA Ladder

**Gambar 1.** Hasil elektroforesis DNA plasmid beberapa isolat *B. thuringiensis* lokal

Nilai perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dapat digunakan sebagai indikator kemurnian DNA. DNA dinyatakan murni apabila memiliki nilai perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm ( $A_{\lambda 260} \cdot A_{\lambda 280}$ ) berkisar 1,8-2 (Ausubel *et al.*, 1992). Hasil pengamatan kualitas DNA dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa rata-rata isolat menghasilkan DNA plasmid dengan nilai perbandingan serapan  $A_{\lambda 260} \cdot A_{\lambda 280} \geq 2$  (Tabel 1). Hal ini menunjukkan masih besarnya kontaminasi RNA dalam sampel yang memang diharapkan karena tidak ada perlakuan dengan RNase dalam isolasi plasmid ini. Menurut Davis *et al.* (1994) dan Johnson (2000), DNA plasmid dengan nilai  $A_{260} \cdot A_{280} > 1,8$  kemungkinan mengandung asam nukleat dan nilai  $A_{260} \cdot A_{280} < 1,6$  kemungkinan mengandung kontaminan seperti protein serta senyawa-senyawa organik lainnya. Selanjutnya, konsentrasi DNA plasmid seluruh isolat disamakan menjadi 50 ng/ $\mu$ l, yaitu konsentrasi DNA yang biasa dipakai pada proses PCR (Davis *et al.*, 1994; Boomer 2001).

## Penapisan Isolat *B. thuringiensis* yang Mengandung Gen *cry1* melalui PCR

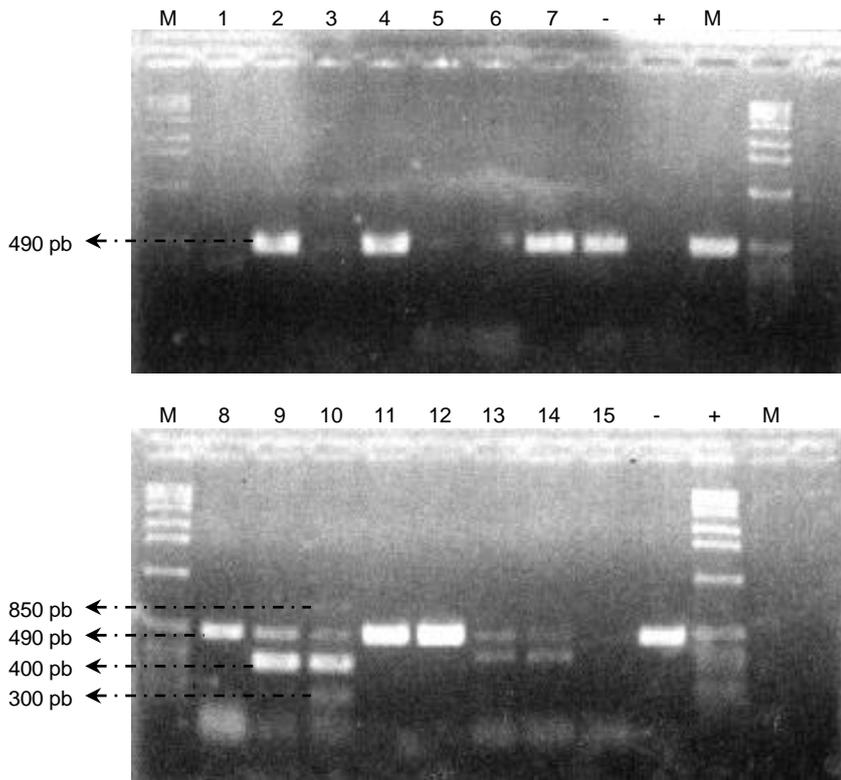
Hasil amplifikasi DNA plasmid menggunakan pasangan primer Lep1A dan Lep1B menunjukkan bahwa dari 15 isolat plasmid *B. thuringiensis* yang diuji, hanya 11 isolat yang menghasilkan pita DNA sebesar 490 pb (Gambar 2). Kesebelas isolat ini adalah Lam864, Jtg2151, C522, G631, C432, Ser455, Ser554, C512, C531, Cib361, dan Lam854. Munculnya pita berukuran 490 pb berarti bahwa isolat-isolat tersebut memiliki segmen DNA yang homolog dengan gen *cry1*. Carozzi *et al.* (1991) menyatakan bahwa amplifikasi DNA dengan pasangan primer Lep1A-Lep1B menghasilkan pita berukuran 490 pb.

Berdasarkan jumlah dan ukuran pita DNA yang dihasilkan, maka 11 isolat yang menghasilkan produk PCR sebesar 490 pb dapat dikelompokkan menjadi 3. Kelompok I menghasilkan hanya 1 pita sebesar 490 pb yang dimiliki oleh isolat Lam864, Jtg2151, C522, G631, C432, C512, dan C531. Kelompok II menghasilkan 2 pita sebesar 490 dan 400 pb yang dimiliki oleh isolat Ser455, Cib361, dan Lam854. Kelompok III menghasilkan 4 pita sebesar 850, 490, 400, dan 300 pb yang dimiliki oleh isolat Ser554.

Isolat-isolat pada kelompok I menghasilkan pola pita sama dengan kontrol positif Dipel<sup>®</sup>, yaitu 1 pita yang terang dan tajam. Isolat Dipel<sup>®</sup> yang digunakan sebagai kontrol positif mengandung bahan aktif *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-7. Höfte dan Whiteley (1989) menyatakan bahwa *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Dipel<sup>®</sup> mengandung gen *cry1Aa* dan *cry1Ac*. Menurut Carozzi *et al.* (1991), pasangan primer Lep1A-Lep1B akan menghasilkan pita sebesar 490 pb terhadap gen *cry1Aa*, *cry1Ab*, dan *cry1Ac*. Jadi, kemungkinan isolat Lam864, Jtg2151, C522, G631, C432, C512, dan C531 mengandung salah satu dari gen *cry1Aa*; *cry1Ab*; dan *cry1Ac*, atau kombinasi dari ketiganya.

**Tabel 1.** Hasil spektrofotometer DNA plasmid isolat *B. thuringiensis* koleksi Balitbiogen

Kode isolat	$A_{\lambda,260}$	$A_{\lambda,280}$	$A_{\lambda,260}/A_{\lambda,280}$	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )
Cib451	1,154	0,547	2,11	5827,7
Lam864	0,448	0,210	2,13	4502,4
Jtm1842	0,527	0,246	2,14	5296,4
Jtg2151	0,479	0,224	2,14	4814,0
Lam861	0,655	0,306	2,14	6582,8
C423	0,582	0,272	2,14	5849,1
C522	0,500	0,236	2,12	5025,0
G631	0,557	0,266	2,09	5597,9
C432	0,197	0,096	2,05	1979,9
Ser455	0,031	0,025	1,24	311,6
Ser554	0,055	0,034	1,62	552,8
C512	0,283	0,132	2,14	2844,2
C531	0,392	0,184	2,13	3939,6
Cib361	0,452	0,216	2,09	4542,6
Lam854	0,342	0,163	2,10	3437,1
Dipel <sup>®</sup>	0,334	0,157	2,13	3356,7



1 = Cib451, 2 = Lam864, 3 = Jtm1842, 4 = Jtg2151, 5 = Lam861, 6 = C423, 7 = C522, 8 = G631, 9 = C432, 10 = Ser455, 11 = Ser554, 12 = C512, 13 = C531, 14 = Cib361, 15 = Lam854, 16 = kontrol positif (Dipel<sup>®</sup>), M = penanda bobot molekul 1 Kb DNA Ladder

**Gambar 2.** Hasil PCR DNA plasmid dengan primer Lep1A dan Lep1B

Isolat pada kelompok II dan III, yaitu Ser455, Cib361, Lam854, dan Ser554 menunjukkan variasi jumlah dan ukuran pita DNA. Munculnya pita DNA tambahan sebesar 300, 400, dan 850 pb menunjukkan pasangan primer yang digunakan menempel pada sekuen lain yang mirip dengan gen *cry1A*. Hal itu kemungkinan karena isolat tersebut mengandung jenis gen *cry1* yang berbeda dengan kelompok I (Lanciotti *et al.*, 1992). Hal ini diperkuat dengan penampakan pita DNA 490 pb dari kelompok ini yang tidak seterang dan setajam kelompok I. Isolat pada kelompok II dan III ini mungkin memiliki gen lain yang mirip dengan gen *cry1* atau gen *cry1* yang telah termutasi. Kemungkinan mutasi ini lebih kuat pada isolat Ser455 dan Ser554 yang menunjukkan pita terang dan tajam dengan ukuran 400 pb. Jadi kemungkinan terdapat *deletion* atau penghilangan sekuen sebesar 90 pb dari gen *cry1* yang dimiliki kedua isolat ini sehingga menghasilkan ampikon yang lebih kecil. Kemungkinan lain yang menyebabkan penempelan primer secara tidak spesifik adalah kondisi proses PCR tidak optimal. Hal tersebut dapat

**Tabel 2.** Hasil amplifikasi DNA plasmid dari *B. thuringiensis* menggunakan primer spesifik untuk *cry1* (Lep1A dan Lep1B)

No.	Kode isolat	Ukuran produk (bp)
1.	Cib451	12 kb
2.	Lam864	9 kb
3.	Jtm1842	18 kb
4.	Jtg2151	15 kb
5.	Lam861	11 kb
6.	C423	-
7.	C522	3 kb
8.	G631	-
9.	C432	2 kb
10.	Ser455	-
11.	Ser554	-
12.	C513	850, 490, 400, 300
13.	C513	490, 400
14.	Cib361	490, 400
15.	Lam854	490, 400

**Gambar 3.** Hasil pemotongan DNA plasmid Jtg2151 dengan beberapa enzim restriksi (*EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI*)

diatasi dengan meningkatkan suhu *annealing*, meningkatkan konsentrasi DNA cetakan, meningkatkan konsentrasi primer, dan meningkatkan jumlah siklus PCR (Lairmore, 1990).

Sebanyak 4 isolat, yaitu Cib451, Jtm1842, Lam861, dan C423 tidak menghasilkan produk PCR. Hasil penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa isolat tersebut tidak menghasilkan pita berukuran 490 pb. Kemungkinan isolat tersebut tidak memiliki segmen DNA yang homolog dengan gen *cry1* (Carozzi *et al.*, 1991). Kemungkinan lainnya adalah isolat tersebut mengandung jenis gen *cry1* atau *cry* lain yang berbeda dengan kelompok I sehingga segmen DNA tidak berkomplemen dengan pasangan primer Lep1A-Lep1B (Ceron *et al.*, 1994; Bravo *et al.*, 1998).

### Pemotongan DNA Plasmid untuk Kloning

Untuk keperluan pembuatan pustaka plasmid, hanya dipilih dua isolat *B. thuringiensis*, yaitu Jtg2151 dan C522 yang telah menunjukkan potensi toksisitas yang tinggi sebanding dengan kontrol Dipel®. Kedua isolat tersebut juga memiliki sekuen gen *cry1A* sebagaimana ditunjukkan dari hasil PCR. Hasil pemotongan DNA plasmid dari isolat Jtg2151 dapat dilihat pada Gambar 3. Terlihat bahwa plasmid DNA Jtg2151 terpotong menjadi fragmen berukuran antara 1 hingga 12 kb oleh enzim pemotong *EcoRI*, *HindIII*, dan *PstI*. Sementara itu, enzim *SmaI* terlihat tidak menghasilkan potongan-potongan DNA dengan ukuran lebih kecil, DNA plasmid terlihat masih berukuran besar sebanding dengan ukuran DNA plasmid yang tidak dipotong. Ukuran dari gen *cry1* utuh adalah sekitar 3 kb, jadi potongan-potongan DNA yang berukuran sekitar 3 kb ini diharapkan membawa gen *cry1* utuh. Dari hasil ini enzim *SmaI* tidak akan dipergunakan dalam pembuatan pustaka plasmid.

Dari hasil pemotretan terlihat bahwa pita-pita DNA plasmid hasil pemotongan dengan enzim restriksi masih terlihat tidak terlalu terang. Hal ini menunjukkan bahwa potongan-potongan DNA yang dihasilkan masih dalam kuantitas yang rendah. Untuk itu, perlu dilakukan pemotongan yang sama dengan jumlah DNA plasmid yang lebih tinggi, sehingga dihasilkan potongan-potongan DNA dalam jumlah yang cukup untuk keperluan pembuatan pustaka plasmid *B. thuringiensis*. Selanjutnya plasmid pGEM7Zf yang akan menjadi vektor kloning akan dipotong dengan ketiga enzim yang sama untuk diligasikan dengan potongan-potongan plasmid Jtg2151.

## KESIMPULAN

Telah diidentifikasi beberapa isolat *B. thuringiensis* lokal yang mengandung gen *cry1* berdasarkan penggandaan DNA plasmid dengan primer spesifik *cry1A*, *Lep1A* dan *1B*. Plasmid yang mengandung sekuen gen ini, dari isolat terpilih Jtg2151, telah diisolasi dan dipotong dengan enzim restriksi. Berdasarkan ukuran DNA plasmid yang terpotong, enzim restriksi *EcoRI*, *HindIII*, dan *PstI* akan dipakai untuk pembuatan pustaka plasmid *B. thuringiensis*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adang, M.J., M.S. Brody, G. Cardeneau, N. Eagan, R.T. Rousch, C.K. Shew-maker, A. Jones, J.V. Oakes, and K.E. McBride. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cry1IIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant. Mol. Biol.* 21:1131-1145.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1992. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, New York. xxiv + 16-89 p.
- Bent, A.F. and I.C. Yu. 1999. Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. *Advances in Agronomy* 66:251-297.
- Boomer, S. 2001. Large scale plasmid preparation and quantitation. [http://www.wou.edu/las/natsci\\_math/biology/boomer/Bio475/midiprep.html](http://www.wou.edu/las/natsci_math/biology/boomer/Bio475/midiprep.html), 10 Oktober 2002.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobus, G. Pena, M. Nunez-Valdez, M. Soberon, and R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus*

*thuringi-ensis* strain collection. Appl. Environ. Microbiol. 64(12):4965-4972.

- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola, and M.G. Koziel. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol. 57(11):3057-3061.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo. 1994.** PCR analysis of the *cry1* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60:353-356.
- Davis, L.G., W.M. Kuehl, and J.F. Battey. 1994.** Basic methods in molecular biology. 2<sup>nd</sup> ed. Appleton & Lange, Norwalk. xiv + 777 p.
- Dent, D.R. 1993.** The use of *Bacillus thuringiensis* as insecticide. D.G. Jones (Ed.). Exploitation of Microorganisms. Chapman and Hall, London.
- Feitelson, J.S. 1993.** The *Bacillus thuringiensis* family tree. In L. Kim (Ed.). Advanced Engineered Pesticides. Marcell Dekker, Inc., New York. p. 63-71.
- González, J.M., H.T. Dulmage, and B.C. Carlton. 1981.** Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5:351-365.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53(2):242-255.
- James, C. 1998.** Global review of commercialized transgenic crops: 1998. ISSAA Briefs No. 8.
- Johnson, A.F. 2000.** Suggestions for sequencing template preparation. 31 Mei. <http://www4.ncsu.edu/unity/users/a/ajohnson/www/template.html>, 10 Oktober 2002.
- Lairmore, T.C. 1990.** Purification and sequencing of PCR product. 11 Mei. [http://hdklab.wustl.edu/lab\\_manual/pcr/pcr3.html](http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/pcr/pcr3.html), 14 Oktober 2002.
- Lanciotti, R.S., C.H. Calisher, D.J. Gubler, G.J. Chang, and A.V. Vorndam. 1992.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Journal of Clinical Micro-biology 30(3):545-551.
- Lereclus, D., A. Delecluse, and M.M. Lacadet. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringi-ensis* toxins and genes. In P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs (Eds.). *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and practice. John Wiley & Sons Ltd., New York. p. 37-61.

**Oka, I.N. and Bahagiawati 1984.** Development and management of a new brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) biotype in North Sumatra, Indonesia. Contr. CRIA No. 71. 33 p.