

BIDANG ILMU*: Bioteknologi pangan

**LAPORAN AKHIR TAHUN
HASIL PENELITIAN HIBAH INTERNAL**



**OPTIMASI SUHU ANNEALING PRIMER UNTUK DETEKSI GEN *CryII*
PADA *Bacillus thuringiensis* ISOLAT LOKAL**

TIM PENELITI

Seprianto, S.Pi, M.Si (0309098702)
Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si (0323029101)

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
FAKULTAS ILMU - ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ESA UNGGUL
NOVEMBER 2019**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : Optimasi Suhu *Annealing* Primer Untuk Deteksi Gen *CryII* Pada *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama lengkap dengan gelar : Seprianto, S.Pi, M.Si
 - b. Pangkat/Gol/NIDN : 0309098702
 - c. Jabatan Fungsional/Struktural : Asisten Ahli
 - d. Pengalaman penelitian : (*terlampir dalam CV*)
 - e. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi
 - f. Fakultas : Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan
 - g. Alamat Rumah/HP : Jl. Ks Tubun Petamburan 3 Kec. Tanah Abang Jakarta Pusat/ 08568942269
 - i. E-mail : seprianto@esaunggul.ac.id
3. Anggota Peneliti 1
 - a. Nama lengkap dengan gelar : Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si
 - b. Pangkat/Gol/NIDN : 0323029101
 - c. Jabatan Fungsional/Struktural : Asisten Ahli
 - d. Pengalaman penelitian : (*terlampir dalam CV*)
 - e. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi
 - f. Fakultas : Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan
4. Jumlah Tim Peneliti : 2 Orang
5. Lokasi Penelitian : Laboratorium Biologi Molekuler UEU
6. Pelaksanaan Kegiatan : 6 bulan
7. Biaya Penelitian : Rp 27.000.000 (*Dua Puluh Tujuh Juta Rupiah*)

Jakarta, 5 Desember 2019


Mengetahui
Dekan Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan


**Universitas
Esa Unggul**
Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan
(Dr. Aprillita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.)
NIK. 215020572

Peneliti


(Seprianto, S.Pi, M.Si)
NIK. 217090707

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Universitas Esa Unggul


**Universitas
Esa Unggul**
L P P M
(Dr. Erry Yudhya Mulyani, S.Gz, M.Sc)
NIK. 209100388

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Optimasi Suhu *Annealing* Primer Untuk Deteksi Gen *CryII* Pada *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal

2. Tim Peneliti

NO	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal	Alokasi Waktu (Jam/minggu)
1	Seprianto, S.Pi, M.Si	Ketua	Rekayasa genetika, Mikrobiologi	Universitas Esa Unggul	20 jam/ minggu
2	Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si	Anggota	Rekayasa genetika	Universitas Esa Unggul	10 jam/minggu

3. Objek Penelitian : Bakteri *Bacillus thuringiensis* isolat lokal

4. Masa Pelaksanaan:

Mulai : Bulan Juni tahun 2019

Berakhir : Bulan November tahun 2019

5. Usulan biaya:

Tahun 1 : Rp. 27.000.000

6. Lokasi Penelitian : Laboratorium Biologi Molekuler LAB TERPADU FIKES Universitas Esa Unggul

7. Instansi lain yang terlibat : Tidak ada

8. Temuan yang ditargetkan : dihasilkan kandidat primer gen penyandi *cryII* dan suhu *annealing* siklus PCR yang tepat dan HKI (Hak Kekayaan Intelektual) serta Publikasi Jurnal Nasional terakreditasi

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu : primer *cry2F* dan *cry2R* yang tepat untuk mendeteksi gen *cyrII* pada *Bacillus thuringiensis* isolat lokal

10. Jurnal Ilmiah yang menjadi sasaran : Proceeding ICOH (Indeks Scopus)

11. Rencana Luaran : Buku non teks

DAFTAR ISI

Isi	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL, GAMBAR, LAMPIRAN	iv
RINGKASAN	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Hasil Luaran Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Karakteristik <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.2. Protein <i>Crystal</i> (Gen <i>cry</i>).....	4
2.3. Suhu <i>Annealing</i> Primer.....	5
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
IV. METODE PENELITIAN	8
4.1. Waktu dan Tempat	8
4.2. Bahan dan Alat	8
4.3. Prosedur Penelitian	8
4.3.1. Desain Primer Degenerate Gen <i>cryII</i>	8
4.3.2. Prekultur <i>B thuringiensis</i>	8
4.3.3. Isolasi DNA <i>B thuringiensis</i>	9
4.3.4. Deteksi Gen <i>cryII</i>	9
V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	10
5.1. Hasil dan Pembahasan	10
5.2. Hasil Luaran Penelitian.....	16
VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	17
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rencana target capaian tahunan.....	2
2. Sepuluh kandidat sekuen gen <i>cryII</i> dari GenBank.....	10
3. Nilai kosentrasi dan kemurnian DNA genom isolat B327 dan B432.....	14

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daerah lestari hasil multiple alignment sekuen gen <i>cryII</i>	11
2. Daerah amplifikasi primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> pada sekuen CDS gen <i>cryII</i>	12
3. Daerah lestari hasil <i>multiple alignment</i> sekuen protein <i>cryII</i>	13
4. Morfologi koloni <i>Bacillus thuringiensis</i> isolat B432 dan B327 pada media Luria Bertani.	13
5. Hasil amplifikasi gen <i>cryII</i> dari isolat Bt.....	15
6. Hasil optimasi suhu <i>annealing</i> untuk amplifikasi gen <i>cryII</i>	16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Curikulum vitae peneliti	21

RINGKASAN

Bacillus thuringiensis merupakan bakteri gram positif yang dapat menghasilkan protein kristal (*crystal proteins*) pada saat bersporulasi. Protein ini mengandung δ -endotoksin yang bersifat toksik pada serangga dan nematoda terutama pada kelompok serangga Lepidoptera, Coleoptera dan Diptera. Salah satu dari protein *cry* ialah gen *cryII* yang mengode protein yang bersifat insektisida terhadap serangga hama Lepidoptera terutama pada spesies *Helicoverpa armigera* yang merupakan hama penggerek jagung. Penelitian ini bertujuan untuk mendapat suhu *annealing* primer yang optimum untuk mendeteksi gen *cryII* pada DNA genom *Bacillus thuringiensis* isolat lokal dengan teknik PCR gradien. Penelusuran sekuen gen *cryII* pada situs NCBI dari GenBank (www.nlm.nih.gov). Desain primer menggunakan beberapa piranti lunak dalam bioinformatika diantaranya Proses penjejarian dilakukan dengan ClustalW diperangkat lunak Bioedit (v7.0.9 Tom Hall). Analisis desain primer dengan Primer3Plus (<https://primer3plus.com>). Dua isolat lokal yang digunakan *Bacillus thuringiensis* adalah isolat B327 dan B432 yang diperoleh dari koleksi dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Isolasi DNA genom mengikuti prosedur standar *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid). Kemurnian DNA diukur dengan nanoquant dengan rasio A260/280 sebesar 1,81 dan 1,88. Deteksi gen *cryII* menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan optimasi suhu *annealing* dengan suhu *annealing* (Ta 50 °C dan 54 °C) menggunakan primer *forward* (*cry2F*) 5'-ATCTGGTCTCATAGGGCGA-3' dan sekuen *reverse* (*cry2R*) 5'-CGAGCTGTCGTTGCTTTG-3' berhasil mengamplifikasi gen *cryII* dengan ukuran pita DNA \pm 500 bp.

Kata kunci: *Bacillus thuringiensis*, Gen *cryII*, PCR, Suhu *annealing*, Primer

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Usaha yang dilakukan dalam pengendalian hama dalam bidang pertanian yaitu dengan pemakaian biopestisida alami. Biopestisida alami banyak digunakan oleh para petani karena mengandung bakteri *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini dapat diisolasi dari tanah, air, permukaan daun dan berbagai bangkai serangga (Bahagiawati, 2002). Keunggulan dari penggunaan bakteri ini sebagai biopestisida antara lain protein yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* bersifat anti serangga spesifik yang disebut sebagai protein *cry*, kependekan dari kata *crystal*. *Bacillus thuringiensis* merupakan bakteri gram positif yang dapat menghasilkan protein kristal (*crystal proteins*) pada saat bersporulasi dalam fase stasioner pada siklus pertumbuhannya (Jain et al., 2017). Protein ini mengandung δ -endotoksin yang bersifat toksik pada serangga dan nematoda terutama pada kelompok serangga Lepidoptera, Coleoptera dan Diptera (Sahin et al., 2018).

Salah satu dari protein *cry* ialah gen *cryII* yang mengode protein yang bersifat insektisida terhadap serangga hama Lepidoptera terutama pada spesies *Helicoverpa armigera* yang merupakan hama penggerek jagung (Lone et al., 2017). Protein *cry* hanya bersifat toksik terhadap jenis serangga tertentu dan tidak toksik terhadap serangga maupun terhadap organisme lain. Ketika masuk ke dalam pencernaan, δ -endotoksin masih dalam bentuk molekul yang besar dan masih dalam bentuk protoksin yang tidak aktif dan akan aktif pada lingkungan basa (Bahagiawati et al, 2009). Kristal ini sebenarnya hanya merupakan protoksin yang jika larut dalam usus serangga akan berubah menjadi poli-peptida yang lebih pendek (27-149 kd) serta mempunyai sifat insektisidal. Toksin yang telah aktif berinteraksi dengan sel-sel epithelium dimidgut serangga. Toksin *B. thuringiensis* menyebabkan terbentuknya pori-pori (lubang yang sangat kecil) di sel membran di saluran pencernaan dan mengganggu keseimbangan osmotik dari selsel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, sel menjadi bengkak dan pecah dan menyebabkan matinya serangga (Mafazah dan Zulaika, 2017)

Upaya yang dilakukan dalam pengembangan produk biopestisida dari galur- galur baru dari *B.thuringiensis* yang membawa protein *cry* memiliki karakteristik yang berbeda, namun penelitian dalam usaha mengisolasi dan mengidentifikasi strain-strain *B. thuringiensis* masih terus dilakukan, karena sejumlah besar serangga hama belum dapat dikendalikan dengan menggunakan toksin yang telah ada. Selain itu, strain-strain baru juga diperlukan untuk

menyediakan alternatif bila muncul resistensi serangga hama terhadap strain *B. thuringiensis* tertentu. Beberapa metode mutakhir telah banyak dikembangkan untuk mendeteksi gen *cry*, salah satunya dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Analisis PCR dengan menggunakan primer spesifik merupakan pilihan yang tepat untuk mendeteksi keberadaan sekuen gen *cryII* dalam DNA genom. Optimasi suhu *annealing* pada tahapan PCR merupakan hal yang sangat penting untuk menghindari kesalahan penempelan primer. Spesifisitas, efisiensi, dan sensitivitas amplifikasi gen dengan PCR dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu faktor yang memengaruhi adalah suhu *annealing* (Yang et al., 2013). Suhu *annealing* adalah suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada DNA target. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya false priming, dan jika suhu *annealing* lebih tinggi dari suhu optimumnya, maka primer tidak dapat menempel pada DNA target sehingga proses PCR tidak berhasil (Adikara et al., 2016). Oleh karena itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi suhu *annealing* yang tepat untuk penempelan primer *cry2F* dan *cry2R* pada DNA genom *B. thuringiensis* serta mendapatkan kandidat primer *degenerate* yang baik dalam mengamplifikasi gen *cryII* dengan teknik PCR gradien.

1.2 Hasil Luaran Penelitian

Luaran penelitian ini adalah publikasi jurnal ilmiah nasional terakreditasi. Luaran lainnya dari penelitian ini adalah menemukan kandidat primer yang baik dalam mengamplifikasi gen penyandi *CryII* dan suhu *annealing* yang tepat sebagai Hak Kekayaan Intelektual (HKI) dalam bentuk laporan penelitian yang belum dipublikasikan.

Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS
1	Artikel ilmiah dimuat di jurnal	Internasional bereputasi			tidak ada
		Nasional terakreditasi		-	
		Nasional tidak terakreditasi	-		
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding	Internasional terindeks	Proceeding ICOH		Submitted

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS
		Nasional	-	SEMNAS	
3	Invited speaker dalam temu ilmiah	Internasional	-	Tidak ada	
		Nasional	-	Tidak ada	
4	Visiting Lecturer	Internasional	-	Tidak ada	
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten	-	Tidak ada	
		Paten sederhana	-	Tidak ada	
		Hak Cipta	-	ada	
		Merk Dagang	-	Tidak ada	
		Rahasia dagang	-	Tidak ada	
		Desain produk Industri	-	Tidak ada	
		Indikasi Geografis	-	Tidak ada	
		Perlindungan Varietas Tanaman	-	Tidak ada	
		Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu	-	Tidak ada	
6	Teknologi Tepat Guna			Tidak ada	
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial ⁸⁾			Tidak ada	
8	Buku Ajar (ISBN)			Tidak ada	
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)				0

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) merupakan bakteri gram positif yang secara taksonomi termasuk kedalam filum Bakteria, kelas Bacilli, famili Bacillaceae, genus *Bacillus* dan spesies *Bacillus thuringiensis* (Holt et al., 1994). Secara morfologi bakteri ini berbentuk batang (*bacil*) dengan ukuran panjang 3-5 μm dan lebar 1,0-1,2 μm serta memiliki flagella. Spora Bt berbentuk oval, letaknya subterminal, berwarna hijau kebiruan, dan berukuran 1,0-1,3 μm . Spora mengandung asam dipikolinik dan terbentuk dengan cepat pada suhu 35°-37°C. Suhu optimum untuk pertumbuhan Bt berkisar antara 10°-50°C (Hermanto et al., 2013). Bt dapat memproduksi kristal protein di inklusi tubuhnya pada saat bersporulasi dalam fase stasioner pada siklus pertumbuhannya (Jain et al., 2017).

Bacillus thuringiensis pertama kali ditemukan di Jepang pada tahun 1901 dari jentik ulat sutera yang mati. Sepuluh tahun kemudian, di Jerman ditemukan strain baru dari Bt pada larva yang menyerang biji-bijian (serealia) di gudang penyimpanan. Strain berikutnya ditemukan di Propinsi Thuringen, maka bakteri ini disebut *Bacillus thuringiensis* yaitu nama yang diberikan pada famili bakteri yang memproduksi kristal paraspora yang bersifat insektisidal. Semula bakteri ini hanya diketahui menyerang larva dari serangga kelas Lepidoptera sampai kemudian ditemukan bahwa bakteri ini juga menyerang Diptera dan Koleoptera (Sahin et al., 2018)

Bioinsektisida *Bacillus thuringiensis* merupakan 90-95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk dipakai oleh petani di berbagai negara. Dengan kemajuan teknologi, gen insektisidal *Bacillus thuringiensis* ini telah dapat diisolasi dan diklon sehingga membuka kemungkinan untuk diintroduksi ke dalam tanaman. Tanaman yang mengekspresikan gen Bt ini dikenal dengan sebutan tanaman transgenik Bt. Tanaman transgenik Bt pertama kali dikomersialkan pada tahun 1995/96 dan luas penanaman Tanaman transgenik terus meningkat (James, 2000). Hasil penelitian di laboratorium ada yang mengindikasikan bahwa beberapa hama dapat menjadi resisten terhadap Bt toksin sehingga beberapa strategi telah diajukan untuk menghindari proses terjadinya resistensi hama Bt (Bahagiawati, 2002)

2.2 Protein *Crystal* (Gen *cry*)

Protein *cry* merupakan kristal protein yang bersifat insektisidal ini sering disebut dengan δ -endotoksin. Kristal ini sebenarnya hanya merupakan protoksin yang jika larut

dalam usus serangga akan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek (27-149 kd) serta mempunyai sifat insektisidal. Pada umumnya kristal Bt di alam bersifat protoksin, karena adanya aktivitas proteolisis dalam sistem pencernaan serangga dapat mengubah Bt protoksin menjadi polipeptida yang lebih pendek dan bersifat toksin. Toksin yang telah aktif berinteraksi dengan sel-sel epithelium di midgut serangga. Bukti-bukti telah menunjukkan bahwa toksin Bt ini menyebabkan terbentuknya pori-pori (lubang yang sangat kecil) di sel membran di saluran pencernaan dan mengganggu keseimbangan osmotik dari sel-sel tersebut. Karena keseimbangan osmotik terganggu, sel menjadi bengkak dan pecah dan menyebabkan matinya serangga. (Bahagiawati, 2002)

Kristal endotoksin Bt telah dikelompokkan menjadi delapan kelas utama, yaitu cryIA sampai cryX berdasarkan homologi sekuen asam amino di N-terminalnya, berat molekulnya, dan aktivitas insektisidalnya (Margino dan Mangundihardjo, 2002). Delapan kelas tersebut adalah *CryI* yang menyerang serangga lepidoptera, *CryII* yang menyerang lepidoptera dan diptera, *CryIII* yang menyerang koleoptera, *CryIV* yang menyerang diptera, *CryV* yang menyerang lepidoptera dan koleoptera, *CryVI* yang menyerang nematoda, *CryIXF* yang menyerang lepidoptera, *CryX* yang menyerang lepidoptera (Sauka dan Benintende, 2017).

Kristal protein yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* juga menyebabkan pembengkakan, pengelupasan, dan kerusakan pada sel-sel epitel usus tengah ulat grayak. Perubahan yang mendasar pada sel-sel usus tengah yang terinfeksi, yaitu adanya pembesaran inti, perubahan retikulum endoplasma hingga konfigurasinya menyerupai vakuola, serta peluruhan atau tidak bersatunya mikrofili. *B. thuringiensis* sebagai bioinsektisida dapat membunuh larva *S. litura* F dengan stadium instar 3, 4 dan 5 dengan persentase kematiannya $\geq 80\%$ pada hari ketujuh sedangkan isolat lain hanya mampu membunuh dengan persentase kematiannya $\geq 70\%$. Ukuran kristal protein sangat menentukan konsentrasi toksin yang larut dalam usus tengah serangga. Bila ukuran kristal protein besar, maka konsentrasi kristal protein yang terlarut juga besar (Mafazah dan Zulaika, 2017)

2.3 Suhu Annealing Primer

Reaksi PCR merupakan salah satu analisis molekuler DNA. PCR merupakan metode yang akurat dalam penggandaan DNA secara enzimatik dalam mesin *thermal cycler* karena kecepatan, sederhana dan efisien dalam mengamplifikasi segmen DNA spesifik dari latar belakang genome yang kompleks. Untuk mendapatkan amplifikasi fragmen gen target dalam hal ini gen *cryII* maka keberhasilan amplifikasi sangat tergantung pada pemilihan primer yang tepat pada saat proses PCR yaitu tahap *annealing* (penempelan) primer pada DNA

(Wang et al, 2017). Primer yang baik berukuran 18-25 basa, mengandung 50-60% G + C dan memiliki suhu leleh (T_m) yang sama. Suhu *annealing* yang digunakan umumnya 50 °C di bawah T_m , dimana formula untuk menghitung $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. Suhu leleh (T_m) primer seharusnya sama atau paling tidak perbedaan antara forward primer dan reverse primer tidak terlalu jauh. Primer-primer yang digunakan dalam PCR sebaiknya memiliki ukuran 17 hingga 28 nukleotida untuk dapat mengamplifikasi target DNA dengan spesifitas yang bagus. Semakin pendek ukuran primer akan menyebabkan terjadinya penempelan primer di tempat lain yang tidak dikehendaki sehingga menyebabkan spesifitas dari primer tersebut berkurang dan berakibat pada efektifitas dan efisiensi proses PCR (Santoso et al., 2013)

Suhu *annealing* adalah suhu yang diperlukan untuk primer berhasil menempel pada DNA target. Suhu *annealing* yang terlalu rendah dari suhu optimum, maka akan menyebabkan terjadinya false priming, dan jika suhu *annealing* lebih tinggi dari suhu optimumnya, maka primer tidak dapat menempel pada DNA target sehingga proses PCR tidak berhasil (Adikara et al., 2016). Suhu *annealing* yang terlalu rendah, akan mengamplifikasi fragmen DNA yang tidak spesifik, hal ini ditandai dengan munculnya banyak pita (Kurniawati dan Hartati, 2018)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan dan sasaran

Penelitian ini memiliki tujuan antara lain : 1) Untuk mendapatkan kandidat primer yang tepat dalam mendeteksi gen penyandi protein *cryII* dari *B. thuringiensis* isolat lokal 2) Untuk mendapatkan suhu penempelan primer (*annealing*) yang tepat untuk mengamplifikasi gen *cryII* dari DNA genom

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan pada penelitian lanjutan untuk kloning gen *cryII* dalam vektor yang dapat diintroduksi ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni – November 2019 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler, Laboratorium Terpadu FIKES Universitas Esa Unggul

4.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *thermocycler* PCR, elektroforesis chamber, Gel Doc, mikrosentrifus, mikropipet dan mikrotub, inkubator, shaker waterbath, cawan petri, laminar air flow dan tips. Sedangkan bahan yang digunakan adalah isolat *B. thuringiensis* isolat lokal dari koleksi InaCC (Indonesian Culture Collection) Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI (isolat B327 and B432), 2 pasang primer gen *cryII*, DNA genom *B. thuringiensis*, PCR mastermixs, Aquabides, LB (luria bertani) Agar, LB cair, Agarose, sybr safe DNA, dan TAE buffer 1x.

4.3. Prosedur Penelitian

4.3.1. Pembuatan Primer Degenerate dan Primer Spesifik Gen *CryII*

Penelusuran sekuen gen *cryII* pada situs NCBI dari GenBank (www.nlm.nih.gov). Sekuen yang digunakan hasil dari pensejajaran gen yang memiliki kemiripan sekuens dari gen *cryII* dari *Bacillus thuringiensis* yang ada di GenBank dengan teknik BLAST. Proses pensejajaran dilakukan dengan ClustalW diperangkat lunak Bioedit (v7.0.9 Tom Hall). Analisis desain primer dengan menggunakan piranti lunak Primer3Plus (<https://primer3plus.com>). Sedangkan desain primer degenerate diambil dari sekuen gen *cryII* yang dirubah kedalam sekuen protein menggunakan tBLASTx dan dilakukan pensejajaran dengan ClustalW. Desain primer dilakukan secara manual berdasarkan kodon asam amino protein *cryII* pada daerah konservatif.

4.3.2. Prekultur *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal

Prekultur isolat *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal dilakukan dengan mengkultur pada media cair Luria Bertani (LB). Kultivasi bakteri dengan menginokulasi 1 koloni bakteri *Bacillus thuringiensis* dari media padat ke media cair LB dengan volume 15 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C ke dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 125 rpm selama 1 – 2 hari. Isolat yang tumbuh dengan baik akan dipanen untuk diisolasi DNANYa.

4.3.3. Isolasi DNA Genom *Bacillus thuringiensis*

Sebanyak 1.5 mL kultur *Bacillus thuringiensis* isolat B432 dan isolat B327 ditransfer ke dalam mikrotub 1,5 mL dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Isolasi DNA selanjutnya mengikuti prosedur standar *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid).

4.3.4. Deteksi Gen *CryII* dengan PCR Gradien

Amplifikasi gen *cryII* menggunakan primer *cry2F* dan *cry2R* dengan 25 μ L reaksi PCR yang mengandung 1 μ L DNA genom 30 μ g/mL, 12.5 μ L PCR Taq Green Master Mix2x (Thermo Scientific), 1 μ L masing-masing primer 10 μ M, 9.5 μ L dH₂O. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus menggunakan Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) dengan teknik PCR gradien untuk mendapatkan suhu *annealing* yang optimal. Kondisi PCR adalah pra-PCR dilakukan selama 3 menit pada suhu 94°C sebanyak satu kali, denaturasi 94°C selama 30 detik,. Untuk optimasi suhu *annealing* menggunakan rentang suhu 50°C – 60°C selama 30 detik, pemanjangan pada 72°C selama 60 detik sebanyak 30 siklus. Pada siklus pasca-PCR dilakukan pada suhu 72°C selama 7 menit. Hasil PCR dimigrasikan di dalam gel agarose 1% pada kondisi 100 volt 40 menit. Setelah itu gel didiamkan dalam buffer TAE 1x yang telah diberi *Cyber Gold*1x selama 30 menit. DNA di dalam gel divisualisasikan dengan UV *transiluminator BIORAD* dan didokumentasikan dengan *Gel –Doc apparatus* (Biometra).

BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil Dan Pembahasan

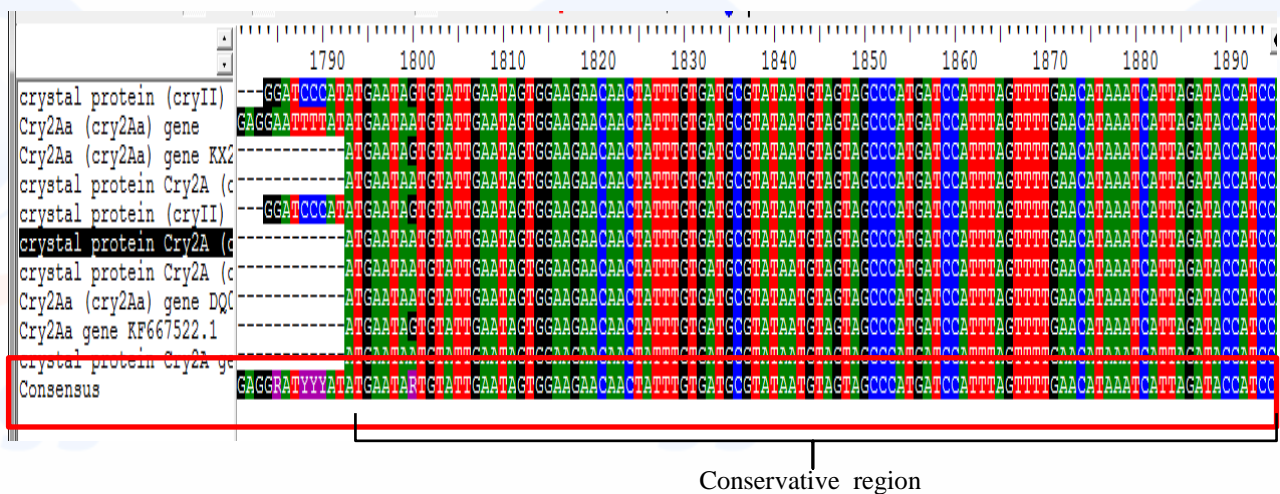
5.1.1. Desain primer untuk amplifikasi gen *cryII*

Dalam mendesain primer, diambil satu sekuen gen *cryII* sebagai cetakan dengan nomor akses (AF047038.1) pada situs NCBI (www.nlm.nih.gov). Hasil penelusuran gen *cryII* (AF047038.1) dengan sekuen gen *cryII* lainnya dengan teknik BLAST diperoleh sepuluh kandidat sekuen gen *cryII* berdasarkan tingkat similitas dengan homologi 99-100%. Adapun kesepuluh sekuen tersebut dengan nomor akses diantaranya (AF047038.1), (AF433645.1), (KX243304.1), (MH475905.1), (MG983754.1), (MG983753.1), (DQ064596.1), (AF273218.1), (MH475907.1), (MK813911.1) seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sepuluh kandidat sekuen gen *cryII* dari GenBank

No	Description	Max score	Total score	Quary cover	E value	Per Ident	Accession
1	<i>Bacillus thuringiensis</i> insecticidal crystal protein (cryII) gene. complete cds	3509	3509	100%	0.0	100 %	AF047038.1
2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain SY49.1 cry2Aa gene. complete cds	3470	3470	99%	0.0	99.97%	KX243304.1
3.	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ly30 cry2Aa gene. complete cds	3469	3469	99%	0.0	99.74%	AF433645.1
4	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T532 insecticidal crystal protein (cry2Aa) gene. complete cds	3465	3465	99%	0.0	99.74%	MH475905.1
5	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T414 insecticidal crystal protein (cry2Aa) gene. complete cds	3465	3465	99%	0.0	99.74%	MG983754.1
6	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T405 insecticidal crystal protein (cry2Aa) gene. complete cds	3465	3465	99%	0.0	99.74%	MG983753.1
7	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar tolworthi Cry2Aa (cry2Aa) gene. complete cds.	3485	3485	98%	0.0	99.74%	DQ064596.1
8	<i>Bacillus thuringiensis</i> cry2Aa (cry2Aa) gene, complete cds	3506	3506	98%	0.0	99.74%	AF273218.1
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T543 insecticidal crystal protein Cry2A gene, complete cds	3480	3480	98%	0.0	99.68%	MH475907.1
10	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T380 Cry2A protein (cry2Aa) gene, complete cds	3480	3480	98%	0.0	99.68%	MK813911.1

Untuk mendesain primer spesifik gen *cryII*, Sepuluh kandidat sekuens gen *cryII* (Tabel 2) disejajarkan (*multiple alignment*) menggunakan clustalW dalam program Bioedit (v7.0.9 Tom Hall) untuk mendapatkan sekuens yang konservatif sebagai syarat dalam mendesain primer yang baik. Hasil pensejajaran sekuens gen *cryII* ini terdapat daerah lestari (*conservative region*) yang berada pada daerah sekuens CDS (*coding sequence*) genom (Gambar 1). Sekuens CDS atau ORF (*open reading frame*) merupakan bagian gen yang mengkode asam amino dalam menghasilkan protein. Dipilih sekuens basa daerah CDS karena memiliki sekuens homolog dengan spesies lainnya namun memiliki basa yang unik (Furuno et al, 2003). Hasil pensejajaran sekuens gen *cryII* dibuat sekuens *consensus* yang dijadikan sebagai cetakan dalam mendesain primer. Rancangan DNA primer menggunakan software *Primer3plus* (<https://primer3plus.com>.) didapat sepuluh kandidat primer yang potensial yang dapat mengamplifikasi gen *cryII*. Dari sepuluh kandidat tersebut dipilih satu primer yang dianggap memenuhi persyaratan dalam mendesain primer yang baik dengan *GC content* 55% dan nilai *Tm* (*temperature melting*) antara 59 – 60 °C. Produk yang dihasilkan ± 500 bp (*basepair*) dengan sekuens primer *forward* (*cry2F*) 5'-ATCTGGTCTCATAGGGCGA-3' dan sekuens *reverse* (*cry2R*) 5'-CGAGCTGTCGTTGCTTTG-3' (Gambar 2). Dalam mendesain primer yang baik suhu *Tm* yang baik berkisar antara 40 – 60 °C. Primer dengan *Tm* terlalu tinggi melebihi 70°C akan mudah mengalami *mispriming* pada temperatur rendah. Pasangan primer sebaiknya tidak memiliki selisih suhu *Tm* yang tinggi antara *forward* dan *reverse* (Borah, 2011). Sedangkan untuk persentasi GC dari kesepuluh primer berkisar antara 50–60%. *GC content* berperan dalam meningkatkan stabilitas primer. Ikatan hidrogen yang kuat pada pasangan basa G dan C menyebabkan primer lebih stabil untuk menempel pada template, sehingga *GC content* disarankan berkisar antara 40% hingga 60% (Lin et al, 2005)

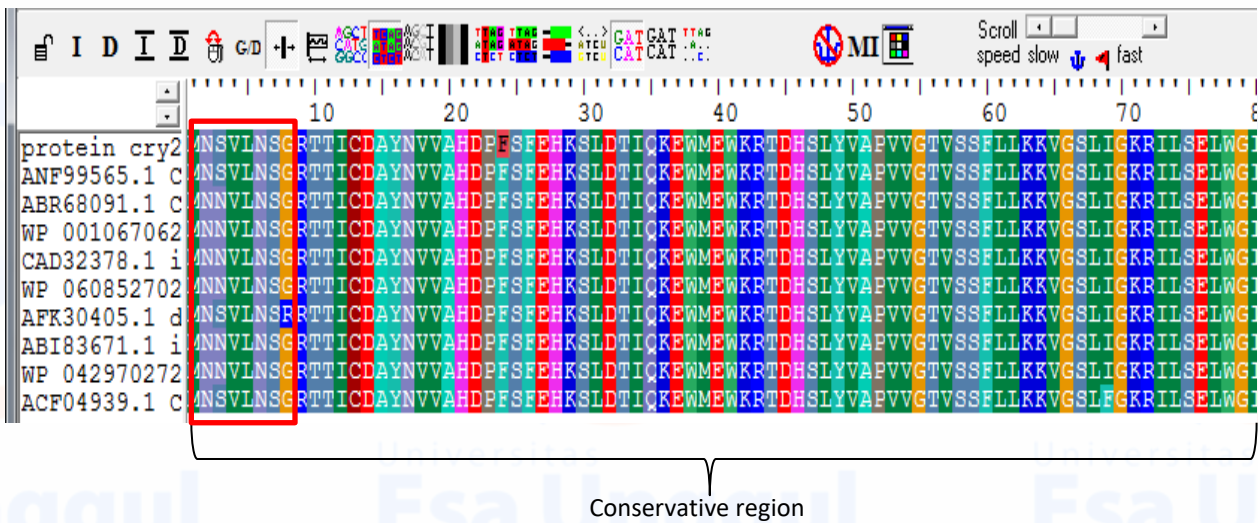


Gambar 1. Daerah lestari hasil *multiple alignment* sekuens gen *cryII*

	Send to Primer3Manager	Reset Form			
1	CTTAAAAAAA	TTCAAGAAAT	ATGATGTTGA	TTCTTAGAGC	AATGAAAGAG
51	TTATTACCCT	GTTTAAGGTG	TCATGATTCT	CCTAGAAAAG	TAGGCAGATG
101	AAGAATGGAC	GATATGCGCA	TACGGATAAC	GTGACTCGTA	AAAAGTACGC
151	TTCGTATATG	ATATGTATAT	TTCAACGTAC	AGTCATCAAA	ATGTAACATG
201	GGAGGCGTGA	AAATATTGTG	ATGAATAATT	GGCATATACC	GTTTACTCCC
251	CACATAGAAT	GTGCAGAGCG	GTTTTAGAGG	TACTTGAAAC	CCATAAATGA
301	AAGTAGAAGG	GGGTGAATAC	CATGCATGAA	TCGCAAGAAG	GTAGAGATGT
351	TCCGAATGGG	ATAACTAAAC	ATAAACACCA	TATACCTTTT	CAGTGTATCG
401	TTTCCCTTCC	ATCAGGTTTT	CAAATTGAAA	AGCCGAATGA	TTTGAAACTT
451	GTTTACGATG	TAAGTCATTT	GTCTATGACG	AAAGATACGT	GTAAAAACG
501	TATTGAGATT	GATGAATGTG	GACAAGTAGA	AATTGACTTA	CAAGTATTA
551	AGATTAAGGG	AGTCTCCTTT	CTTTTATCGG	GAATTTTTCT	ATTGAACCCA
601	TTGTGTGTGA	AAACATGTAT	ACAACGGTGG	ACAGAAATCC	ATCTATTTCC
2801	ATAGTGCCAG	GGTTAATTAT	AGCGGAGGAG	TTTCATCTGG	TCTCATAGGG
2851	GCGACTAATC	TCAATCACAA	CTTTAATTGC	AGCACGGTCC	TCCCTCCTTT
2901	ATCAACACCA	TTTGTTAGAA	GTTGGCTGGA	TTCAGGTACA	GATCGAGAGG
2951	GCGTTGCTAC	CTCTACGAAT	TGGCAGACAG	AATCCTTTCA	AACAACTTTA
3001	AGTTTAAGGT	GTGGTGCTTY	TTCAGCCCGT	GGAAATTCAA	ACTATTTCCC
3051	AGATTATTTT	ATCCGTAATA	TTTCTGGGGT	TCCTTTAGTT	ATTAGAAACG
3101	AAGATCTTAAC	AAGACCGTTA	CACTATAACC	AAATAAGAAA	TATGAAAGT
3151	CCTTCGGGAA	CACCTGGTGG	AGCACGGGCC	TATTTGGTAT	CTGTGCATAA
3201	CAGAAAAAAT	AATATCTATG	CCGCTAATGA	AAATGGTACT	ATGATCCATT
3251	TGGCGCCAGA	AGATTATACA	GGATTTACTA	TATCGCCAAT	ACATGCCACT
3301	CAAGTGAAYA	ATCAAACTCG	AACATTTATT	TCTGAAAAAT	TTGGAATCA
3351	AGGTGATTCC	TTAAGATTG	AACAAGCAA	CACGACAGCT	CGTTATACGC
3401	TTAGAGGGAA	TGGAARTAGT	TACAATCTTT	ATTTAAGAGT	ATCTTCAATA
3451	GGAAATTCAA	CTATTGAGT	TACTATAAAC	GGTAGAGTTT	ATACTGTTTC
3501	AAATGTTAAT	ACCMCTACAA	ATAACGATGG	AGTTAATGAT	AATGGAGCTC
3551	GTTTTYCAGA	TATTAATATC	GGTAATATAG	TAGCAAGTGA	TAATACTAAT
3601	GTAACGCTAG	ATATAAATGT	GACATTAAC	TCCGGTACTC	CATTTGATCT
3651	CATGAATATT	ATGTTTGTGC	CAACTAATCT	TCCACCCTT	TATTAAGGTT
3701	TGAGT				

Gambar 2. Daerah amplifikasi primer *forward* dan *reverse* pada sekuen CDS gen *cryII*

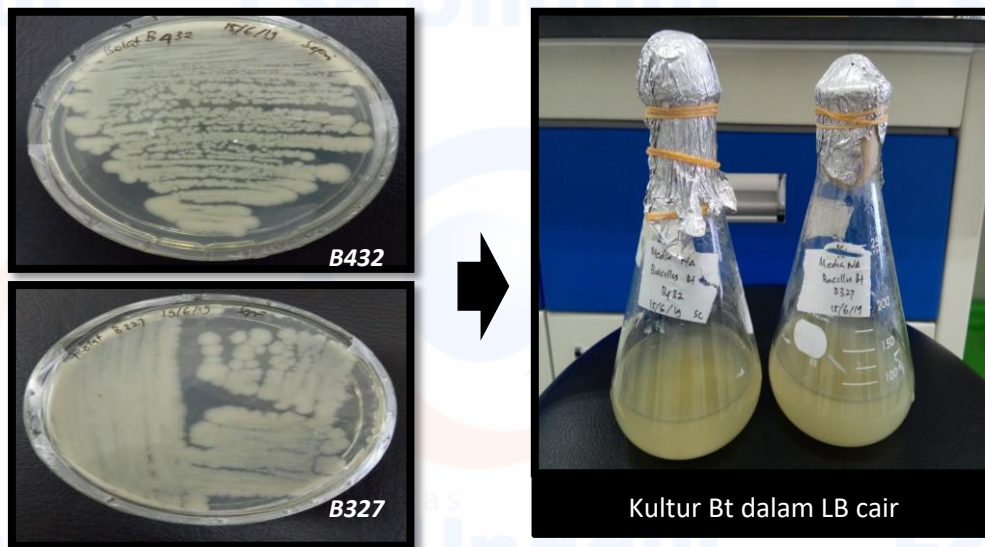
Desain primer degenerate menggunakan sekuen protein *cryII* dari hasil penelusuran tBLASTx (*translated nucleotide to protein*) yang disejajarkan (*multiple alignment*) dengan ClustelW pada software BioEdit. Desain primer dilakukan secara manual berdasarkan kodon asam amino protein *cryII* pada daerah lestari (Gambar 3). Menggunakan sistem International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) untuk basis degenerasinya dan memasukkan kode satu huruf untuk mewakili sekuen nukleotida seperti menggunakan 'S' di tempat GC, dan 'V' di tempat AGC. Hasil analisis diperoleh daerah lestari yang dijadikan sebagai cetakan primer yaitu sekuen protein “MNSVLNS” dengan hasil terjemahan berdasarkan kodon asam amino sekuen forward (Bt2D-F) 5'- ATGAAYWVNGTNAAYWSNGGN-3' dan untuk sekuen *reverse* (Bt2D-F) “RTCNTGCATRRTRATCATRAA” dari terjemahan *reverse complement* sekuen protein ‘FMINML” dengan prediksi produk amplifikasi ±1500 bp (*basepair*). Optimasi kandidat primer melibatkan optimasi dalam suhu *annealing* (Ta) menggunakan PCR gradien dan optimasi konsentrasi primer. Selain primer, optimalisasi reaksi PCR juga dilakukan untuk memeriksa deteksi minimum dan kuantifikasi asam nukleat dalam reaksi, dan hal ini membutuhkan kerja di laboratorium untuk menghasilkan tes PCR yang baik (Saraswati, Wahyuni, & Seprianto, 2019) .



Gambar 3. Daerah lestari hasil *multiple alignment* sekuen protein cryII

5.1.2. Prekultur *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus thuringiensis*. Isolat bakteri berasal dari koleksi kultur InaCC (*Indonesian Culture Collection*) Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dengan kode isolat B327 and B432 (Gambar 4). Isolat bakteri diremajakan selnya dengan menumbuhkan pada medium LB (*Luria Bertani*) dan diinkubasi selama 24 jam. Pemilihan medium LB dikarena medium tersebut dapat menstimulus pertumbuhan spora dan protein kristal dari *Bacillus thuringiensis* (Mafazah dan Zulaika, 2017).



Gambar 4. Morfologi koloni *Bacillus thuringiensis* isolat B432 dan B327 pada media Luria Bertani

5.1.3. Isolasi DNA Genom *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal

Isolasi DNA genom *Bacillus thuringiensis* isolat B432 dan B327 menggunakan *Presto mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid) dengan mengambil sebanyak 3 ml kultur bakteri dalam medium LB cair. Hasil isolasi DNA selanjutnya dilakukan pengukuran kemurnian dan konsentrasi masing – masing DNA menggunakan Nanoquant (*TECAN Multimode Reader*). Tujuan pengukuran ini untuk membandingkan ekstrak DNA dalam satuan nano gram per satu mikroliter pada panjang gelombang A260/280 (ng/ μ L) berdasarkan nilai absorbansi. Nilai absorbansi berguna untuk mendeteksi kontaminan seperti protein, garam dan polisakarida yang dapat menghambat amplifikasi DNA (Kurniawati dan Hartati, 2018).

Rasio pada pembacaan panjang gelombang 260/280 nm sebesar 1,8 menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi memiliki kemurnian tinggi dengan tidak adanya protein dan fenol (Latif dan Osman, 2017). Hasil pengukuran kemurnian DNA genom menunjukkan kemurnian yang baik dengan rasio A260/280 masing – masing isolat B432 sebesar 1,88 dan isolat B327 sebesar 1,81 (Tabel 3). Menurut Pervaiz et al. (2011), rasio A260/A280 dengan rentang mulai dari 1.8 hingga 2.0 tidak menunjukkan adanya kontaminasi yang signifikan.

Tabel 3. Nilai Konsentrasi dan kemurnian DNA genom Isolat B327 dan B432

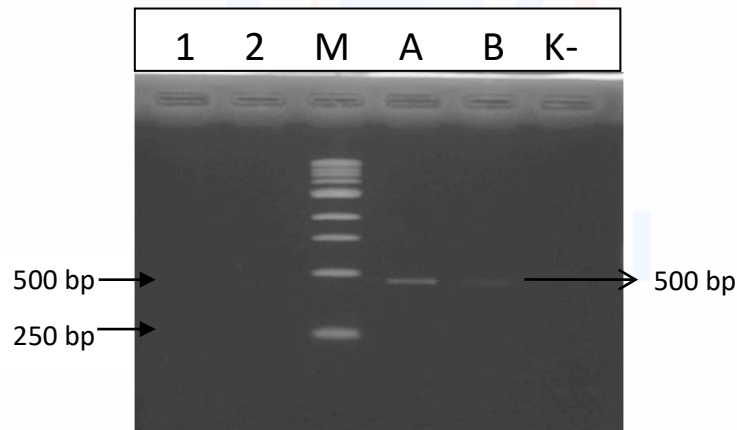
Kode isolat	Absorbansi λ 260	Absorbansi λ 280	Kosentrasi (ng/ μ l)	Kemurnian (A260/A280)
B327	0,0128	0,0070	12,7	1,81
B432	0,0028	0,0015	2,80	1,88

5.1.4. Deteksi gen *cryII* Menggunakan Primer Degenerate dan Primer Spesifik

Dua pasang primer yang telah didesain digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *cryII* pada genom *Bacillus thuringiensis* isolat B432 dan B327. Amplifikasi gen *cryII* dengan metode PCR (*Polymerase chain Reaction*) menggunakan 2 pasang primer (Bt2D-F/ Bt2D-R dan *cry2F/ cry2R*). Hasil PCR menunjukkan bahwa primer *cry2F/cry2R* dapat mengamplifikasi gen *cryII* pada kedua isolat dengan terbentuknya pita DNA tunggal dengan ukuran \pm 500 bp (*basepair*) (Gambar 5). Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa primer yang digunakan adalah primer yang spesifik. Semakin spesifik primer yang digunakan semakin sedikit pula DNA fragmen yang dihasilkan pada saat amplifikasi DNA target.

Sedangkan amplifikasi dari primer *degenerate* tidak ada pita yang dihasilkan dari masing - masing isolat (Gambar 5). Hal ini dikarenakan kurangnya sensitifitas primer terhadap DNA cetakan. Selain itu primer *degenerate* tersusun atas campuran sekuen oligonukleotida dan sekuen protein yang membuat primer kurang spesifik terhadap DNA

cetakan dan membuat primer susah menempel. Peruntukan primer *degenerate* umumnya untuk mengidentifikasi varian gen yang tidak diketahui dari gen yang sama pada individu berbeda (Inserete et al, 2013). Menurut Green et al., (2015) reaksi PCR merupakan reaksi yang sensitif terhadap ketidaksesuaian antara primer dan cetakan, dan ketidakcocokan ini dapat menyebabkan amplifikasi yang tidak efisien pada daerah cetakan DNA yang ditargetkan.



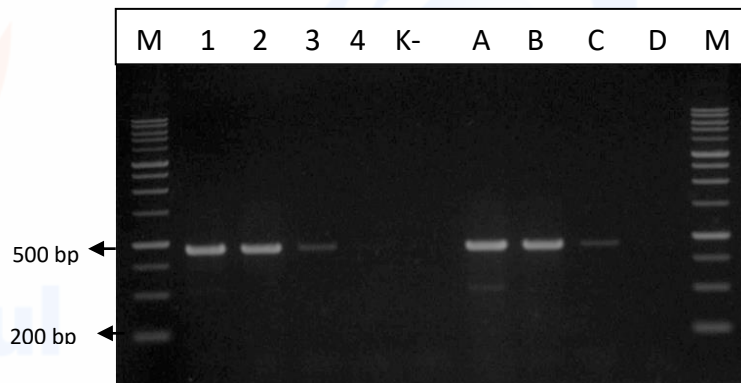
Gambar 5. Hasil amplifikasi gen *cryII* dari isolat Bt. (M) 1Kb DNA Ladder. (1: isolat B432, 2: isolat B327) primer *degenerate* Bt2D-F/ Bt2D-R. (A: isolat B432, B: isolat B327) primer *cry2F/cry2R* (K-) kontrol negatif.

5.1.4. Optimasi Suhu *Annealing* Primer *cry2F/cry2R* dengan PCR Gradien

Optimasi suhu *annealing* (T_a) untuk mendeteksi gen *cryII* dari *Bacillus thuringiensis* isolat B327 and B432 dengan PCR gradien. Amplifikasi gen menggunakan primer spesifik *cry2F/cry2R* dengan nilai T_m (*temperature melting*) antara 59 – 60 °C. Pita DNA berhasil teramplifikasi dengan jelas dan tebal pada ukuran ± 500 bp dengan suhu *annealing* (T_a 50 °C dan 54 °C), namun pada suhu *annealing* (T_a 56 °C) menghasilkan pita DNA yang tipis, sedangkan pada suhu *annealing* (T_a 60 °C) tidak ada pita yang dihasilkan (Gambar 6). Hal ini diasumsikan karena suhu *annealing* (T_a) yang terlalu tinggi sehingga produktivitas PCR menjadi rendah.

Suhu yang diperlukan untuk penempelan primer ini tergantung pada komposisi basa, panjang, dan konsentrasi DNA. Suhu *annealing* terbaik biasanya 2-5 °C di bawah T_m . T_m merupakan suhu pada saat setengah dari molekul DNA mengalami denaturasi. Pada suhu terlalu tinggi menyebabkan penempelan primer spesifik tetapi konsentrasi amplicon yang didapatkan sangat kecil sehingga suhu *annealing* sangat kritis pada proses amplifikasi DNA target. Sedangkan suhu terlalu rendah menyebabkan pita DNA target yang diharapkan hasilnya tidak spesifik. T_a yang terlalu tinggi akan menghasilkan hibridisasi primer-cetakan

DNA tidak cukup sehingga mengakibatkan rendahnya produk PCR, sedangkan T_a yang terlalu rendah akan mengarah pada amplifikasi yang tidak spesifik yang disebabkan oleh tingginya kemungkinan kesalahan penempelan primer pada cetakan DNA (Santoso, et al 2015)



Gambar 6. Hasil optimasi suhu *annealing* untuk amplifikasi gen *cryII*. (M). DNA Marker 100 bp Ladder. (sampel 1-4) DNA isolat B432 (1) T_a 50 °C, (2) T_a 54 °C, (3) T_a 56 °C, (4) T_a 60 °C. (sampel A-D) isolat B327, (A) T_a 50 °C, (B) T_a 54 °C, (C) T_a 56 °C, (D) T_a 60 °C. (K-) Kontrol negatif

5.2. Hasil Luaran Penelitian

Luaran penelitian ini adalah publikasi jurnal ilmiah nasional tidak terakreditasi. Luaran lainnya dari penelitian ini adalah menemukan kandidat primer yang baik dalam mengamplifikasi gen *cryII* sebagai Hak Kekayaan Intektual (HKI) sebagai temuan terbaru yang sebelumnya belum pernah diteliti dan dipublikasikan

BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan penelitian berikutnya adalah:

- Sekuensing Gen parsial cryII
- Perbanyak gen cryII dalam plasmid pGEM®-T Easy
- Ligasi ke dalam Vektor Biner T-DNA
- Transformasi ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens*

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini menggunakan *Bacillus thuringiensis* isolat lokal B432 dan B327. Kemurnian DNA genom isolat B432 dan B327 dengan rasio A260/280 sebesar 1,88 dan 1,81. Deteksi gen *cryII* menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan optimasi suhu *annealing* dengan suhu *annealing* (Ta 50 °C dan 54 °C) menggunakan primer *forward* (*cry2F*) 5'-ATCTGGTCTCATAGGGCGA-3' dan sekuen *reverse* (*cry2R*) 5'-CGAGCTGTCGTTGCTTTG-3' berhasil mengamplifikasi parsial gen *cryII* dengan ukuran pita DNA \pm 500 bp. Untuk memastikan kebenaran dari gen *cryII* yang di amplifikasi, produk PCR yang terbentuk harus sekuensing.

DAFTAR PUSTAKA

- Adikara IJ, Wirajana IN, Yowani SC. 2016. Optimasi Suhu *Annealing* Tiga Regio Berbeda Isolat Multidrug Resistance *Mycobacterium Tuberculosis* dengan Metode *Multiplex Polymerase Chain Reaction*. *Jurnal Veteriner*. Vol. 17 No. 4 : 535-539. <https://doi:10.19087/jveteriner.2016.17.4.535>
- Abdel-Latif, A., G. Osman. 2017. Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize. *Plant Methods* 13 (1):1-9.
- Bahagiawati, Rizjaani H, Sibuae AK. 2009. Toksisitas Isolat *Bacillus thuringiensis* yang Mengandung Gen cry 1A Terhadap Hama Penggerek Batang Jagung, *Ostrinia furnacalis* Guenee. *Jurnal Biologi Indonesia*. 6 (1): 97-105
- Bahagiawati. 2002. Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai Bioinsektisida. *Buletin AgroBio* 5(1):21-28
- Borah P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*, vol. 11(3):134-136.
- Green, S. J., R. Venkatramanan., A. Naqib. 2015. Deconstructing the Polymerase Chain Reaction: Understanding and Correcting Bias Associated with Primer Degeneracies and Primer-template Mismatches. *PlosOne* 10 (5):e0128122.
- Hermanto S, Jusuf E, and. Shiddiqi MH. 2013. Eksplorasi Protein Toksin *Bacillus thuringiensis* dari Tanah di Kabupaten Tangerang. *Valensi*, 3(1) pp. 48–56, 2013.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley J, and Williams S, Bergey's. 1994. *Manual of Determinative Bacteriology*. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins.
- Iserte JA., Stephan BI, Goni SE, Borio CS, Ghiringhelli PD, Lozano ME. (2013) Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Res Int* 2013:38364
- Jain D, Sunda SD, Sanadhya S, Nath DJ, Khandelwal SK. 2017. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Biotech*. 7:4. <https://doi:10.1007/s13205-016-0583-7>
- James, C. 2000. Global review of commercial transgenic crops: 2000. ISAAA Briefs. No. 21: Preview. ISAAA: Ithaca, New York.
- Kurniawati S, Hartati NS. 2018. Optimasi Suhu *Annealing* Primer *Degenerate* untuk Mengamplifikasi Fragmen Gen *Arginine Decarboxylase* (ADC) Genom Ubi Kayu Lokal Maluku Tenggara. *Jurnal ILMU DASAR*, 19 (2):135-142. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JID>
- Lin, FM, Huang HD, Huang HY, and Horng JT. 2005. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm. *Conf. Genet. Evol. Comput.* – GECCO 05, p. 475
- Lone SA, Malika A, Padariab JC. 2017. Characterization of lepidopteran-specific cry1 and cry2 gene harbouring native *Bacillus thuringiensis* isolates toxic against *Helicoverpa armigera*. *Biotechnology Reports* 15 (2017) 27–32 <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2017.05.001>
- Mafazah A, Zulaika E. 2017. Potensi *Bacillus thuringiensis* dari Tanah Perkebunan Batu Malang sebagai Bioinsektisida terhadap Larva *Spodoptera litura* F. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 6 (2) 2337-3520 (2301-928X Print)

- Margino, S. dan S. Mangundihardjo. 2002. Pemanfaatan keanekaragaman hayati untuk biopestisida di Indonesia. Lokakarya Keanekaragaman Hayati untuk Perlindungan Tanaman. Yogyakarta, 7 Agustus 2002.
- Pervaiz, Z., N. Turi.,I. Khaliq., M. Rabbani., S. A. Malik. 2011. Modified Method Forhigh-Quality DNA Extraction for Molecular Analysis in Cereal Plants. *Genet Mol Res J.* 10:1669–1673.
- Sahin B, Cebolla JG, Gu'neş H, Ferre J. 2018. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins. PLoS ONE. 13 (11): e0206813. <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Santoso, T. J., Hidayat, S. H., Herman, M., & Sudarsono (2015). Aplikasi Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Menggunakan Primer Degenerate dan Spesifik Gen AV1 Untuk Mendeteksi Begomovirus Pada Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 4(3), 140. <https://doi.org/10.29244/jhi.4.3.140-149>
- Saraswati, H., Wahyuni, F. D., & Seprianto, S. (2019). Desain Primer Secara In Silico untuk Amplifikasi Gen cryIII dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(1), 33–38.
- Sauka DH, Benintende GB. 2017. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2017;49(3):273-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.003>
- Yang L, Wang C, Wang L, Xu C, Chen K. 2013. An Efficient Multiplex PCR Assay for Early Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in Transgenic Plant Material. *Turk J Agric For* 37: 157-162.
- Wang JG, Xia F, Zeleke J, Zou B, Rhee S and Quan ZX. 2017. An improved protocol with a highly degenerate primer targeting copper-containing *membrane-bound monooxygenase* genes for community analysis of methane- and ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 93 fiw244. <http://doi:10.1093/femsec/fiw244>

Lampiran 1. Bioadata Tim Peneliti

Biodata Ketua Peneliti

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Seprianto, S.Pi, M.Si
2	Jenis Kelamin	L
3	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
4	NIP/NIK/No. identitas lainnya	1471020909870022
5	NIDN	0309098702
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Duku, 09 September 1987
7	E-mail	seprianto@esaunggul.ac.id
8	Nomor Telepon/HP	085213179687
9	Nama Institusi	Universitas Esa Unggul
9	Alamat Kantor	Jl Raya Arjuna no. 9 Kebun Jeruk Jakarta Barat
10	Nomor Telepon/Faks	021-5674223

B. Riwayat Pendidikan

Program:	S-1	S-2	S-3
Nama PT	Universitas Riau	Institut Pertanian Bogor	-
Bidang Ilmu	Ilmu Kelautan	Bioteknologi	-
Tahun Masuk-Lulus	2005-2010	2013-2016	-
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Isolasi dan identifikasi bakteri probiotik dari usus udang windu (<i>Peneus monodon</i>) dengan teknik sekuens 16S rDNA	Penapisan <i>Streptomyces</i> sp penghasil <i>Microbial Transglutaminase</i> dan pengklonan DNA penyandinya melalui konstruksi pustaka genom	
Nama Pembimbingan/Promotor	Prof. Dr. Feliatra, DEA	Prof. Dr. Suharsono, DEA	

C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir

(Bukan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi)

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2016			
2	2017	Isolasi dan Penapisan Bakteri selulolitik dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase	Internal	24.000.000,-
3	2018	Analisis Bioinformatika Gen Penyandi Potensial <i>HalichondrinB</i> dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker	Internal	24.000.000,-
4	2019	Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Primer Degenarate Untuk Deteksi Gen <i>CryII</i> pada <i>Bacillus</i> Isolat Lokal	Internal	24.000.000,-

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema penelitian DIKTI maupun dari sumber lainnya

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 3 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
3	2017	Pemberian Wawasan dan Pengarahan tentang Keilmuan Bioteknologi pada Sekolah Tingkat SMA atau Sederajat di Jakarta dan Tangerang	Internal	1.500.000
4	2018	Pengenalan Instrumentasi Laboratorium Bagi Guru Biologi SMA/SMK Se Jabodetabek.	Mandiri	-
5	2019	PKM Peningkatan Mutu Kualitas Pangan Lokal Berbasis Pangan Fermentasi di Pulau Payung, Kepulauan Seribu	Internal	13.500.000,-

*Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema pengabdian kepada masyarakat DIKTI

E. Publikasi Artikel Ilmiah Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	2016	Cloning of a Transglutaminase Gene from <i>Streptomyces thioluteus</i> TTA 02 SDS 14	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
2	2016	Screening of Indonesian <i>Streptomyces</i> sp. Capable of Secreting Transglutaminase (MTGase) and Optimization of MTGase Prodction Using Different Growth Media.	Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest Biotechnology (P3DSPBKP-KKP)	11/I/2016
3	2017	Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik Dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase	Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity	I/II/2017
4	2018	Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik Dari Usus Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i>) Berdasarkan Sekuens Gen 16S rDNA	Biogenesies	V/II/2018
5	2018	Candida Antarctica Lipase B Synthetic Gene: A Bioinformatics Analysis	BioScience	II/II/2018
6	2019	Analisis Bioinformatika Gen Potensial Penyandi <i>HalichondrinB</i> dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker	Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity	II/I/2018

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
7	2019	Desain Primer secara In Silico Untuk Aplikasi Gen CryIII Pada <i>Bacillus thuringiensis</i> Isolat Lokal	Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity	III/I/2019

F. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 3 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Jurnal Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	2017	Seminar Nasional : Genetic Engineering of Biotechnology	Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik Dari Berbagai Jenis Tanah Sebagai Penghasil Enzim Selulase	Universitas Esa Unggul
2	2018	Seminar Nasional, Menggali Potensi Tanaman Melalui DNA	Skrining <i>Streptomyces spp</i> Penghasil <i>Microbial Transglutaminase</i> (MTGase) dan Kloning Gen MTGase	Universitas Esa Unggul
3	2019	International Conference Of Biotechnology and Life Sciences (IC-BIOLIS)	Application of Polymerase Chain Reaction for Detection of CryII Gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> Local Isolates as a specific Toxin in Borers	Universitas Esa Unggul dan IPSBI
4	2019	International Conference on Health (ICOH)	In Silico Analysis for Detection CryII Gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> Local Isolates	FIKES Universitas Esa Unggul

G. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1				
2				
3				
Dst				

H. Perolehan HKI dalam 5-10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1	Analisis Bioinformatika Gen Potensial Penyandi <i>HalichondrinB</i> dari Spons Laut Sebagai Kandidat Anti Kanker	2019	Laporan Hasil Penelitian	EC002193813 2/000140646
2				
3				
Dst				

I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang Telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

J. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1			
2			
3			
Dst			

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan penugasan penelitian dosen pemula.

Jakarta, 21 Desember 2019

Ketua Pengusul

(Seprianto, S.Pi, M.Si)

Biodata Anggota Peneliti

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd., M.Si.
2	Jenis Kelamin	Perempuan
3	JaFung	Asisten Ahli
4	NIDN (jika ada)	0323029101
5	Tempat dan Tanggal Lahir	Probolinggo, 23 Februari 1991
6	E-mail	febriana@esaunggul.ac.id
7	Nomor telepon/HP	081291789560
8	Nama Institusi Tempat Kerja	Universitas Esa Unggul
9	Alamat Kantor	Jalan Arjuna Utara No. 9, RT 1/ RW 2, Duri Kepa, Kebon Jeruk, Jakarta Barat
10	Nomor telepon/Faks	(021) 5674223

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2
Nama Perguruan Tinggi	Universitas Jember	Institut Pertanian Bogor
Bidang Ilmu	Biologi	Bioteknologi
Tahun masuk-lulus	2009-2013	2013-2016
Judul Skripsi/Tesis	Pengaruh Ekstrak n-Heksan Daging Buah Delima Putih (<i>Punica granatum</i>) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Darah pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i> L.) dan Pemanfaatannya sebagai Buku Splemen	Konstruksi Vektor dan Ekspresi Protein Rekombinan Lipase <i>Candida 25ntarctica</i> (Cal B) dengan <i>Cellulose Binding Module</i> (CBM) pada <i>Pichia pastoris</i>
Nama Pembimbing	1. Dr. Iis Nurasyiah, S.P.,M.P 2. Slamet Hariyadi, M.Si	1. Prof. Dr. Suharsono, DEA 2. Dr. Asrul Muhamad Fuad

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

(buka skripsi, tesis, dan disertasi)

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jumlah
1	2012	SABU <i>Punica granatum</i> – Sari Buah Delima sebagai Minuman Antikolesterol Tanpa Efek Samping	DIKTI	10.566.000
2	2015	Ekspresi Konstitutif Protein Rekombinan <i>Candida 25ntarctica</i> Lipase B pada <i>Pichia pastoris</i>	DIPA	30.000.000
3	2018	Analisis Bioinformatika dalam Pembuatan gen Sintetik <i>Cellulose</i>	Hibah Internal	20.000.000

		-binding module dari Trichoderma		
4	2018	Analisis Bioinformatika dalam Pembuatan Gen Sintetik Candida antarctica Lipase B (<i>CalBsyn</i>) dari Khamir Psycrophilic <i>Candida antarctica</i>	DIKTI	16.000.000

D. Publikasi Artikel Ilmiah dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/Nomor/Tahun
1.	Pengaruh Ekstrak n-Heksan Daging Buah Delima Putih (<i>Punica granatum</i>) terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Darah pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i> L.) dan Pemanfaatannya sebagai Buku Suplemen	Pancaran Pendidikan	2 (4): 89-99/2013
2.	Constitutive Expression of <i>Candida 26antarctica</i> Lipase B (<i>Calb</i>) in <i>Pichia pastoris</i> Using pGAPZ α Vector	Annales Bogor iense	20 (1): 31-38/2016
3.	<i>Candida antarctica</i> Lipase B Synthetic Gene : A Bioinformatics Analysis	Bioscience	2(2):20-29/2018

E. Pemakalah Seminar Ilmiah (*Oral Presentation*) dalam 5 tahun terakhir

No	Nama Temu Ilmiah/ Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan “ Teknologi Berkelanjutan dalam Melestarikan Biodiversitas Lokal	Analisis Bioinformatika dalam Pembuatan Gen Sintetik Candida antarctica Lipase B (<i>CalBsyn</i>) dan Perancangan Primer Spesifik	20 Oktober 2018 di UIN Raden Fatah Palembang
2	Seminar dan Workshop “ Menggali Potensi Tanaman Melalui DNA	Subkloning gen <i>cbm</i> ke dalam Plasmid Rekombinan <i>pGAPZ-C alBsyn</i> untuk produksi Protein Rekombinan Lipase	28 November 2018 di Universitas Esa Unggul

F. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit

--	--	--	--	--

G. Perolehan HKI dalam 10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1	Analisis Bioinformatika dalam Pembuatan Gen Sintetik Candida antatica Lipase B (<i>Cal Bsyn</i>) dari Khamir Psycrophilic <i>Candida antartica</i>	2018	Laporan Hasil Penelitian	000121357

H. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 10 Tahun Terakhir

No	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat

I. Penghargaan dalam 10 tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan penugasan penelitian dosen pemula.

Jakarta, 21 Desember 2019

Anggota

(Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si)

Lampiran 2. Susunan Organisasi dan Pembagian Tugas Tim Peneliti

No	Nama	Instansi Asal	Bidang Tugas	Uraian Tugas	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)
	Seprianto, S.Pi, M.Si	Universitas Esa Unggul	Biologi Molekuler, Rekayasa Genetika	Desain Primer, Optimasi primer, PCR gradien	20
	Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd, M.Si	Universitas Esa Unggul	Biologi Molekuler, Mikrobiologi	Inokulasi Bakteri, Perbanyak biakan <i>B thuringiensis</i>	10