

**LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH INTERNAL PAYUNG**



**Penapisan gen *cryI* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal dengan Metode  
*Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

**PENGUSUL**

**Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd., M.Si.      0323029101**

**Dr. Henny Saraswati, M.Biomed      0328087802**

**Program Studi Bioteknologi  
Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan  
Universitas Esa Unggul Jakarta  
Desember, 2019**

**HALAMAN PENGESAHAN  
PENELITIAN HIBAH INTERNAL PAYUNG**

**Judul Penelitian** : Penapisan gen *cryI* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

**Peneliti**

a. Nama lengkap : Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd., M.Si.  
b. NIDN : 0323029101  
c. Jabatan Fungsional/Struktural : Asisten Ahli  
d. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi  
e. No. HP : 081291789560  
f. Alamat E-mail : febriana@esaunggul.ac.id

**Anggota Peneliti**

a. Nama lengkap : Dr. Henny Saraswati, M.Biomed  
b. NIDN : 0328087802  
c. Jabatan Fungsional/Struktural : Lektor/Kepala Pusat Studi Fikes  
d. Program Studi/Jurusan : Bioteknologi  
e. No. HP : 081281701911  
f. Alamat E-mail : hennysaraswati@esaunggul.ac.id

**Biaya Penelitian** : Rp 27.000.000,-

Jakarta, 1 Juni 2020

Mengetahui  
Dekan Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan



(Dr. Aprillita Rina Yanti-Eff., M.Biomed., Apt.)  
NIK. 215020572

Peneliti



(Febriana Dwi Wahyuni, S.Pd., M.Si.)  
NIK. 218080753

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

  
(Dr. Erry Yudhya Muliyani, S.Gz., M.Sc.)  
NIK. 209100388

## IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Penapisan gen *cryI* dari *Bacillus thuringiensis* Isolat Lokal dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1	Febriana Dwi Wahyuni, M.Si.	Ketua	Rekayasa genetika	Universitas Esa Unggul	20 jam/minggu
2	Dr. Henny Saraswati, M.Biomed	Anggota	Mikrobiologi	Universitas Esa Unggul	10 jam/minggu

3. Objek Penelitian : bakteri *Bacillus thuringiensis*
4. Masa Pelaksanaan :  
Mulai : bulan Mei tahun 2019  
Berakhir : bulan Oktober tahun 2019
5. Usulan biaya LPPM Universitas Esa Unggul:  
Tahun I : Rp 27.000.000,-
6. Lokasi Penelitian (Lab/Studio/Lapangan) : Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Esa Unggul
7. Instansi lain yang terlibat : Tidak ada
8. Temuan yang ditargetkan : dihasilkan suatu gen *cryI*
9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu : diperoleh suatu gen *cryI* yang memiliki ketahanan terhadap hama yang menyerang tanaman
10. Hasil luaran : publikasi di jurnal Bioedukasi (SINTA3), prosiding, dan HKI

## DAFTAR ISI

Halaman Sampul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Identitas dan Uraian Umum .....	iii
Daftar Isi .....	iv
Ringkasan .....	v
Bab 1 Pendahuluan .....	1
Bab 2 Tinjauan Pustaka .....	4
Bab 3 Metode Penelitian .....	7
Bab 4 Hasil dan Pembahasan .....	9
Bab 5 Kesimpulan .....	14
Daftar Pustaka .....	15
Lampiran	

## RINGKASAN

*Bacillus thuringiensis* (Bt) merupakan bakteri yang menghasilkan protein kristal yang bersifat toksik terhadap serangga dan nematoda selama masa sporulasi. Keunggulan dari penggunaan bakteri ini sebagai biopestisida antara lain protein yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* bersifat antiserangga spesifik dan disebut sebagai protein Cry. Protein Cry hanya bersifat toksik terhadap jenis serangga tertentu dan tidak toksik terhadap serangga yang berguna maupun terhadap organisme lain. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen *cryI* pada isolat lokal *B.thuringiensis* secara cepat dan akurat dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini antara lain perbanyakan isolat bakteri *B. thuringiensis*, isolasi genom *B. thuringiensis*, dan penapisan gen *cryI* dengan metode PCR. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai isolat-isolat *B. thuringiensis* yang mengandung gen *cryI* sehingga isolat tersebut dapat digunakan lebih lanjut, baik untuk keperluan rekayasa genetika maupun biopestisida. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa gen *cryI* berhasil diamplifikasi menggunakan primer spesifik *cryI* forward 5'- CGGTGAATGCC CTGTTTACT-3' dan *cryI* reverse 5'- CGGTCTGGTTGCCTATTGAT -3' dengan adanya pita DNA berukuran sekitar 200 pasang basa

Kata kunci : skrining, *Bacillus thuringiensis*, gen *cryI*, PCR

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1. Latar belakang

Salah satu kendala dalam produksi suatu komoditas tanaman di negara beriklim tropis dan lembab adalah serangan organisme pengganggu tumbuhan (OPT) seperti serangga hama dan patogen tumbuhan (Herman, 2002). Bahkan pada tanaman tertentu seperti padi, serangga hama masih merupakan kendala utama dan menjadi masalah serius, misalnya wereng coklat dan penggerek batang (Herman, 2002). Usaha pengendalian yang biasa dilakukan petani adalah penyemprotan insektisida. Penggunaan insektisida disinyalir menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan dan menyebabkan resistensi pada serangga target. Adanya kekhawatiran tentang dampak negatif dari penggunaan insektisida telah meningkatkan perhatian masyarakat terhadap bioinsektisida sebagai alternatif untuk menurunkan populasi hama (Bahagiawati, 2003).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) merupakan bakteri yang menghasilkan protein kristal yang bersifat toksik terhadap serangga dan nematoda selama masa sporulasi (N. P. A. Saraswati, 2007). Bioinsektisida Bt merupakan 90-95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk dipakai oleh petani di berbagai negara (Bahagiawati, 2003). Keunggulan dari penggunaan bakteri ini sebagai biopestisida antara lain protein yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* bersifat antiserangga spesifik dan disebut sebagai protein Cry (dari kata *crystal*) atau disebut juga dengan nama  $\delta$ -endotoksin. Protein Cry hanya bersifat toksik terhadap jenis serangga tertentu dan tidak toksik terhadap serangga yang berguna maupun terhadap organisme lain (N. P. A. Saraswati, 2007).

Berkembangnya teknologi DNA rekombinan saat ini memungkinkan untuk melakukan transformasi gen *cry* ke dalam sel tanaman. Introduksi gen *cry* ke dalam genom tanaman diharapkan tanaman tersebut mengekspresikan endotoksin yang dapat menyebabkan kematian serangga hama. Dengan cara ini pula diharapkan dapat mengurangi penggunaan insektisida yang dapat mencemari lingkungan.

Berdasarkan perbedaan dalam untaian asam amino penyusunnya, telah diidentifikasi lebih dari 300 macam protein Kristal  $\delta$ -endotoksin. Setiap jenis protein Cry bersifat toksik spesifik terhadap serangga atau nematoda tertentu sehingga diperlukan metode khusus untuk mendeteksi dan mengidentifikasi protein Cry sebelum

protein Cry tersebut diaplikasikan. Salah satu cara untuk mengetahui tipe protein Cry pada suatu isolat *B. thuringiensis* adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik PCR merupakan prosedur yang dapat menentukan keberadaan sekuens DNA target secara cepat.

Penelitian ini merupakan penelitian tahap awal untuk memperoleh tanaman tahan hama. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen *cryI* pada isolat lokal *B.thuringiensis* secara cepat dan akurat dengan metode PCR. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai isolat-isolat *B. thuringiensis* yang mengandung gen *cryI* sehingga isolat tersebut dapat digunakan lebih lanjut, baik untuk keperluan rekayasa genetika maupun biopestisida.

## 2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk penapisan gen *cryI* dari *Bacillus thuringiensis* isolat lokal untuk pembuatan pustaka plasmid Bt dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) .

## 3. Hasil Luaran penelitian

Luaran penelitian adalah dihasilkan suatu gen *cryI* yang memiliki ketahanan terhadap serangga Lepidoptera. Luaran lainnya dari penelitian ini adalah publikasi jurnal ilmiah nasional terakreditasi dan HKI.

Tabel 1.1. Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian		
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS <sup>1)</sup>	TS+ 1	TS+ 2
1	Artikel ilmiah dimuat di jurnal <sup>2)</sup>	Internasional bereputasi		Tidak ada			
		Nasional Terakreditasi	<i>publishe d</i>		v		
		Nasional tidak terakreditasi		Tidak ada			
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding <sup>3)</sup>	Internasional terindeks		<i>Published di IOP Scopus</i>	v		
		Nasional		Tidak Ada			
3	<i>Invited speaker dalam temu</i>	Internasional		Tidak Ada			
		Nasional		Tidak Ada			

	ilmiah <sup>4)</sup>						
4	<i>Visitting Lecturer</i> <sup>5)</sup>	Internasional		Tidak Ada			
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) <sup>6)</sup>	Paten		Tidak Ada			
		Paten Sederhana		Tidak Ada			
		Hak Cipta		Tidak Ada			
		Merek 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 <sup>7)</sup>			Tidak Ada			
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial <sup>8)</sup>			Tidak Ada			
8	Bahan Ajar <sup>9)</sup>			Draft			
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) <sup>10)</sup>			1			

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) telah dikenal sebagai biokontrol agen sejak tahun 50an. Bakteri ini tersebar di berbagai tempat pada hampir semua penjuru dunia. Pertama kali dijumpai di Jepang pada tahun 1901 yang membunuh ulat sutera di tempat pemeliharaan. Sepuluh tahun kemudian, di Jerman ditemukan strain baru dari Bt pada larva yang menyerang biji-bijian (serealia) di gudang penyimpanan. Karena 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 (Bahagiawati, 2003).

*B. thuringiensis* merupakan bakteri bersifat Gram-positif, aerob, saprofit pembentuk endospora yang terdapat di tanah, air, dan di permukaan tumbuhan (Nair et al., 2018). Berbagai jenis isolat dan subspecies *B. thuringiensis* sangat dikenal sebagai sumber yang bernilai untuk biopestisida penting komersial. Bakteri ini memenuhi syarat sebagai agen pengendali mikrobiologi terhadap hama dan vektor penyakit tumbuhan sehingga aplikasi biopestisida ini cepat tersebar. Semua subspecies *B. thuringiensis* yang dikenal memproduksi sejumlah besar protein kristal insektisida yang bersegregasi dalam tubuh paraspora ( $\delta$ -endotoksin) selama masa sporulasi, yang ketika ditelan, bersifat toksik untuk berbagai macam serangga (Jain, Sunda, Sanadhya, Nath, & Khandelwal, 2017). Kristal protein ini memiliki aktivitas toksik spesies terhadap serangga tertentu (Dagga, Aziz, Al Amnama, Al-Sharif, & El Hindi, 2016). Protein CryI diketahui toksik terhadap Lepidoptera, sedang CryII toksik terhadap Lepidoptera dan Diptera. CryIII diketahui mampu membunuh Coleoptera, dan CryIV toksik terhadap Diptera. Oleh karena memberikan derajat toksisitas dan aktivitas insektisida yang berbeda, perlu diketahui marka molekuler yang dapat membedakan antarstrain. Gen protein kristal insektisida terdapat dalam plasmid konjugasi dan tersusun dalam kluster atau dalam operon diperantarai oleh *insertion sequences*. Karakterisasi koleksi strain *B. thuringiensis* dapat membantu mengetahui peran bakteri ini di lingkungan dan distribusi gen *Cry* (Suryanto, 2017).

## 2.2. Gen *cry*

Gen yang mengendalikan protein Cry disebut gen *cry*. Gen *cry* dapat berada pada plasmid, kromosom, atau keduanya. Klasifikasi terbaru mengenai pembagian jenis gen *cry* dibuat oleh Dr. D.R. Zeigler dari Departement Biochemistry, The Ohio State University USA. Spesies bakteri ini dibedakan menjadi 68 subspecies dengan istilah *serovar* yang ditentukan berdasarkan perbedaan sifat antigen *flagella*-nya. Setiap subspecies ini dibedakan lagi berdasarkan perbedaan sifat protein Cry, toksisitas maupun karakter genetik lainnya dengan istilah strain (galur). Setiap galur memiliki toksisitas yang spesifik dengan serangga target yang spesifik pula (N. P. A. Saraswati, 2007). Setiap jenis protein memiliki nama gen sesuai dengan nama proteinnnya, misalnya untuk penyandi protein Cry4Aa adalah gen *cry4Aa*.

Beberapa subspecies dari bakteri Bt, yaitu *kurstaki*, *aizawai*, *sotto*, *entomocidus*, *Berliner*, *sandiego*, *tenebroid*, *morrisoni*, dan *israelensis*. Umumnya lebih dari satu jenis Kristal protein ditemukan dalam strain Bt. Gen yang mengkode Kristal protein yang dihasilkan oleh bakteri ini telah diisolasi dan dikarakterisasi, dikenal dengan sebutan gen *cry* yang berasal dari kata *crystal*.

Kristal endotoksin Bt telah dikelompokkan menjadi delapan kelas utama, yaitu *cry1A* sampai *cryX* berdasarkan homologi sekuen asam amino di N-terminalnya, berat molekulnya dan aktivitas insektisidalnya. Delapan kelas tersebut adalah:

1. *CryI* yang menyerang serangga Lepidoptera
2. *CryII* yang menyerang Lepidoptera dan diptera
3. *CryIII* yang menyerang koleoptera
4. *CryIV* yang menyerang diptera
5. *CryV* yang menyerang Lepidoptera dan koleoptera
6. *CryVI* yang menyerang nematode
7. *CryIXF* yang menyerang Lepidoptera
8. *CryX* yang menyerang Lepidoptera

## 2.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

*Polymerase Chain Reaction (PCR)* adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. Reaksi PCR pertama kali diperkenalkan oleh Kary Mullis pada tahun 1985 (Yusuf, 2010). Teknik ini merupakan teknik penggandaan

molekul DNA yang melibatkan penggunaan primer, yaitu bagian kecil dari pasangan komplementer DNA yang akan disintesis dan DNA polymerase yang tahan panas (N. P. A. Saraswati, 2007). Metode ini memiliki banyak kelebihan yaitu dapat menghasilkan amplifikasi produk yang akurat, cepat, spesifik, dan hanya membutuhkan sampel yang sedikit (Bakri, Z. Hatta, M, & Massi, M, 2015). Teknik PCR sangat sensitif, dapat menggandakan sampai lebih dari sejuta kali sehingga dapat menghasilkan DNA dalam jumlah yang sangat besar. Oleh karena itu, teknik ini hanya membutuhkan cetakan DNA dalam jumlah kecil.

Reaksi PCR berlangsung dalam tiga tahapan, yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan *elongation* (pemanjangan nukleotida). Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu DNA cetakan, oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), enzim DNA polymerase dan komponen pendukung lain berupa senyawa buffer (Yusuf, 2010).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1. Gen *cryI Bacillus thuringiensis*

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *cryI B. thuringiensis* (kode genbank AY518201.1) yang dapat diunduh pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

### 3.2. Blast

Selanjutnya gen tersebut dianalisis dengan perangkat lunak software *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) dengan strain *B. thuringiensis* lainnya sehingga didapatkan nilai identity dari mulai yang tertinggi sampai yang terendah. Sekuen gen yang memiliki nilai identity tinggi digunakan dalam metoda multiple alignment untuk mendapatkan sekuen yang conserved.

### 3.3. Multiple Alignment

Penentuan daerah lestari ditentukan dengan menggunakan program Bioedit. Urutan basa yang diperoleh disejajarkan dengan Program *ClustalW* untuk kemudian dipilih yang paling memiliki kesamaan dalam basa penyusunnya dengan kemiripan 80-100 %. Sebagai dasar pelacakan penempelan primer (Novianti, 2019).

### 3.4. Desain Primer

Dilakukan analisis penentuan DNA primer dengan perangkat lunak *Primer3*, dan secara manual dipilih daerah yang paling lestari dengan mempertimbangkan daerah tersebut adalah daerah urutan sandi, dengan persyaratan umum, antara lain jumlah nukleotida, kandungan GC dan tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplementer antar basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

### 3.5. Analisis Primer Dimer

Adakalanya primer yang dirancang dapat mengenali urutan dari diri mereka sendiri, mengikat satu sama lain membentuk struktur yang disebut dimer. Hal ini bisa menjadi masalah karena primer akan cenderung saling menempel, tidak dengan gen target dan hal ini dapat mengurangi konsentrasi DNA. Untuk itu perlu dilakukan analisis prediksi

dimer dengan menggunakan *software* yang tersedia untuk memprediksi keberadaan dimer pada kandidat primer, yaitu DINAmelt (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAmelt>) yang dibuat oleh N.M Markham dan Michael Zucker dari Rensselaer Polytechnic Institute. Dari hasil analisis menggunakan DINAmelt ini dapat diketahui apakah dimer terbentuk di primer, berapa banyak pembentukan ikatan G-C, dan keberadaan ujung 3' komplemen.

### 3.6. Analisis Situs Restriksi

Untuk mengetahui situs restriksi yang terdapat pada gen *cryI* maka dilakukan analisis dengan menggunakan *software* SnapGene. Tujuan diketahuinya situs restriksi tersebut agar gen dapat dipotong dengan salah satu enzim restriksi endonuklease yang diinginkan.

### 3.7. Amplifikasi gen *cryI* dengan PCR

Amplifikasi gen *cryI* menggunakan primer spesifik *cryI* forward 5'-CGGTGAATGCCCTGTTTACT-3' dan *cryI* reverse 5'-CGGTCTGGTTGCCTATTGAT-3' dengan total volume 25 µl yang mengandung 1 µl DNA genom, 12,5 µl PCR HS *redmix* master mix (Bioline), 1 µl masing-masing primer dan 9,5 ddH<sub>2</sub>O. Amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus menggunakan *Sensoquest*. Untuk satu kali siklus terdiri dari 3 tahapan yaitu denaturasi, penempelan, dan pemanjangan. Tahap predenaturasi dilakukan selama 3 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C sebanyak satu kali, tahap denaturasi 95<sup>0</sup>C sebanyak 1 menit, tahap penempelan primer pada suhu 50-60<sup>0</sup>C selama 1 menit, perpanjangan rantai DNA pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 1 menit. Pada siklus terakhir dilakukan pemanjangan rantai lebih lama pada suhu 72<sup>0</sup>C selama 5 menit.

### 3.8. Elektroforesis Hasil PCR

Hasil PCR dimigrasikan ke dalam gel agarose 1% pada kondisi 100 volt 30 menit. Marker DNA 1 kb digunakan sebagai penanda. Pewarnaan gel menggunakan *fluorosafe DNA stain* yang langsung ditambahkan ke dalam gel agarose. Gel yang berisi fragmen DNA divisualisasikan dengan menggunakan *UV Trans Illuminator* dan didokumentasikan menggunakan *gel Documentation System Digibox Camera*.

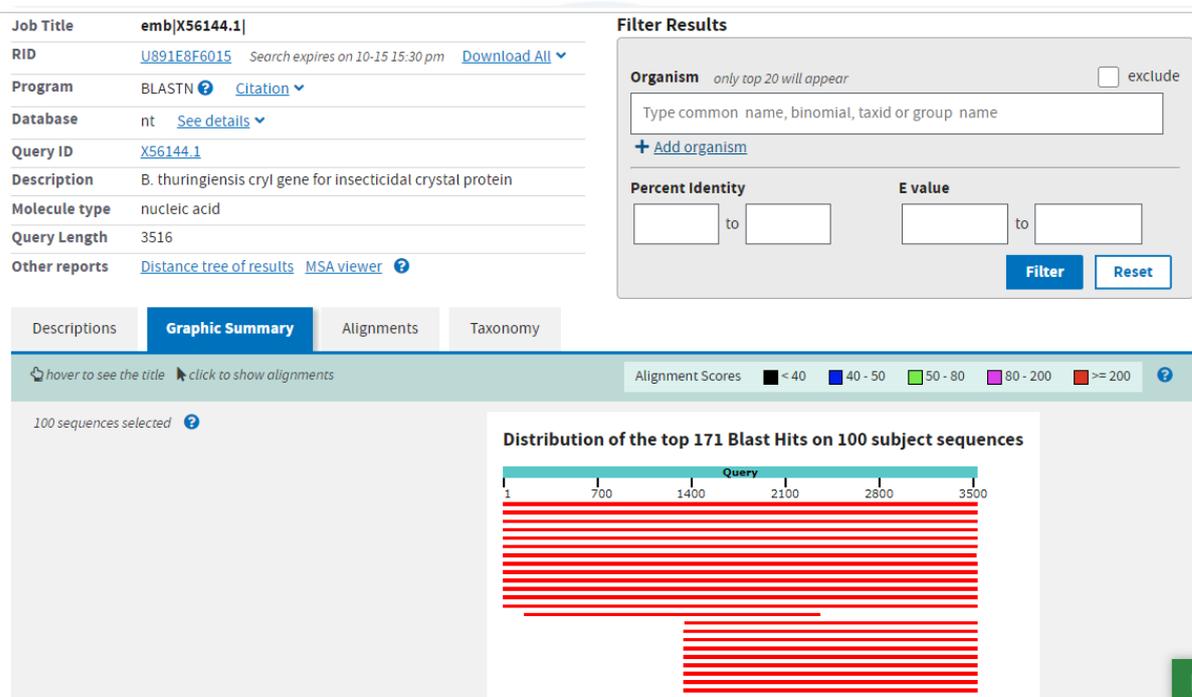
## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Sekuen Gen *cryI*

Sebagai cetakan untuk mendesain primer, digunakan gen *cryI* *B. thuringiensis* (kode genebank X56144), yang dapat diunduh pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) terdiri dari 3516 pasang basa.

### 4.2. Basic Local Alignment Search Tools (BLAST)

Proses BLAST dilakukan pada gen *cryI* dari *B. thuringiensis* dibandingkan dengan berbagai strain. Hasil BLAST diperoleh nilai identity sebesar 100-96% gen *cryI* dari beberapa strain *B. Thuringiensis*.



Gambar 1. BLAST gen *cryI* dengan beberapa strain dari *Bacillus thuringiensis*

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy		
<b>Sequences producing significant alignments</b>						
Download Manage Columns Show 100						
select all 100 sequences selected						
GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> B. thuringiensis cryI gene for insecticidal crystal protein	6493	6493	100%	0.0	100.00%	X56144.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis BIX I gene for crystal protein	6493	6493	100%	0.0	100.00%	X53985.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis Cry032 (cry032) gene complete cds	6482	6482	100%	0.0	99.94%	AF202531.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis (cryIE(a)) gene complete CDS	6482	6482	100%	0.0	99.94%	M73252.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BRC-XQ12 insecticidal crystal protein Cry1Ea11 (cry1Ea11) gene partial cds	6477	6477	99%	0.0	99.94%	JQ652456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain BR64 Cry1Ea10 (cry1Ea10) gene complete cds	6471	6471	100%	0.0	99.89%	HQ435318.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain S6 Cry1E-like protein gene complete cds	6469	6469	99%	0.0	99.91%	HQ439785.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain HZM2 Cry1Ea gene complete cds	6466	6466	100%	0.0	99.86%	EU244426.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis isolate JC190 insecticidal delta endotoxin CryIEa (cryIEa) gene complete cds	6466	6466	100%	0.0	99.86%	AY894137.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis protoxin Cry1Ea4 (cry1Ea4) gene complete cds	6460	6460	100%	0.0	99.83%	U94323.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar tolowrhi plasmid pKK2 DNA complete genome strain: Pasteur Institute Standard strain	6139	6139	99%	0.0	98.21%	AP014866.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain FB Cry1Ea (cry1Ea) gene partial cds	6130	6130	99%	0.0	98.18%	JN226101.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain V4 Cry1Ea gene partial cds	6111	6111	99%	0.0	98.09%	KF601559.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis delta-endotoxin Cry1-A32 (cry1-A32) gene partial cds	3616	3616	62%	0.0	96.36%	AY993931.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar gallerae strain HD-29 plasmid pBMB426 complete sequence	2929	5427	61%	0.0	90.81%	CP010090.1

Gambar 2. Analisis identity gen *cryI* dengan *cryI* dari strain lain *Bacillus thuringiensis*

### 4.3. Multiple alignment

Dari beberapa strain hasil BLAST yang memiliki nilai identity sekuen DNA 100-96% dilakukan multiple alignment, sehingga diperoleh beberapa strain dengan sekuen DNA gen *cryI* yang memiliki sekuen DNA sejajar (Gambar 3). Dipilih sekuen sejajar pada daerah CDS yang sesuai dengan sekuen DNA primer yang telah dirancang dengan software Primer3.



Gambar 3. Proses multiple alignment gen *cryI* dengan strain *Bacillus thuringiensis* lainnya yang memiliki nilai identity sekuen DNA 100-96 % menggunakan software Bioedit

#### 4.4. DNA Primer gen cryI

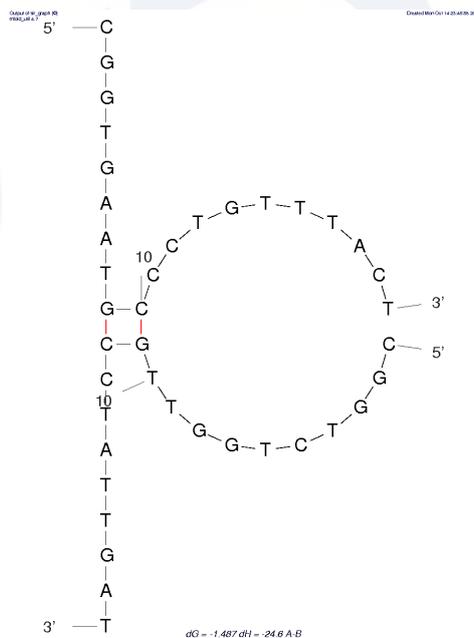
Rancangan DNA Primer gen cryI dari *Bacillus thuringiensis* menggunakan software primer3 yang telah melewati proses BLAST dan multiple alignment (Tabel 1).

Tabel 1. Desain primer untuk amplifikasi gen cryI

Primer ( <i>cryI</i> )	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	GC%	Self 3' complementarity
Forward	CGGTGAATGCCCTGTTTACT	60	50	1
Reverse	CGGTCTGGTTGCCTATTGAT	60	50	2

#### 4.5. Struktur Dimer pada Kandidat Primer

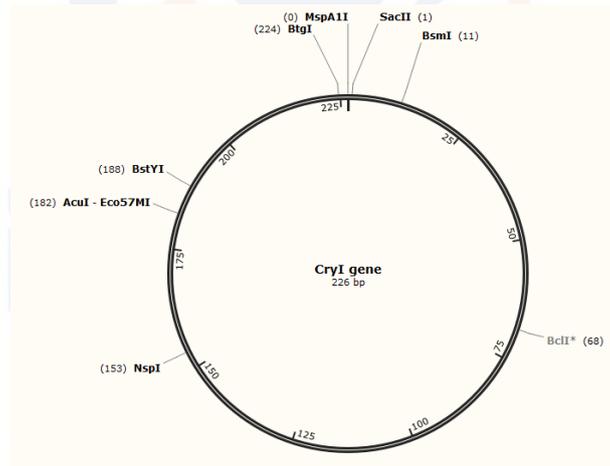
Hasil analisis dengan software DINAmelt, dapat diketahui bahwa pada primer yang telah didesain hanya mempunyai 1 ikatan G-C. Hal ini menguntungkan karena dapat meningkatkan konsentrasi DNA dan meminimalisasi terjadinya ikatan antar primer.



Gambar 5. Gambar ini menunjukkan hasil analisis DINAmelt untuk memprediksi struktur dimer pada pasangan primer yang dirancang sebelumnya

#### 4.6. Peta gen cryI

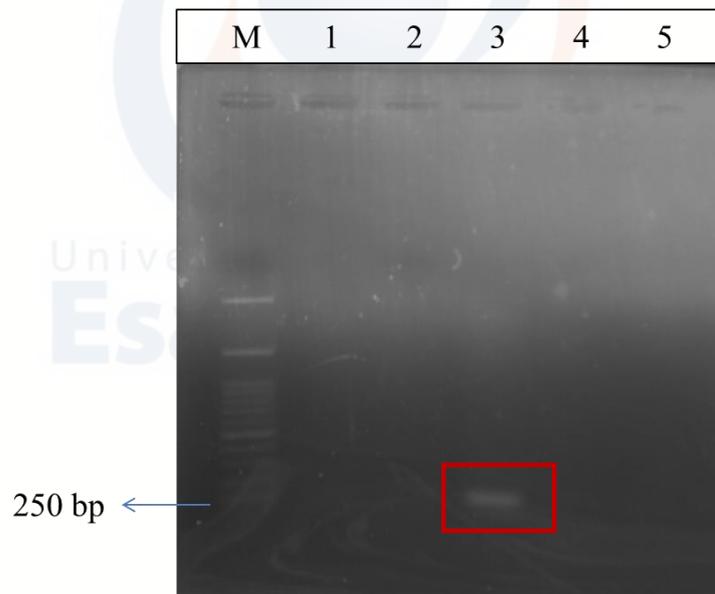
Dari hasil analisis menggunakan snapgene, dapat diketahui bahwa gen cryI yang diamplifikasi mempunyai 8 situs restriksi.



Gambar 6. Peta gen *cryI*

#### 4.7. Elektroforesis Hasil PCR

Hasil visualisasi DNA yang sudah diamplifikasi dengan primer *cryI* forward dan *cryI* reverse menunjukkan adanya pita DNA dengan ukuran sekitar 200 bp.



Gambar 7. Hasil amplifikasi DNA gen *cryI*

#### Pembahasan

Desain primer merupakan langkah awal yang menentukan keberhasilan amplifikasi DNA dengan metode PCR [10]. Proses desain primer dilakukan menggunakan aplikasi bioinformatika. Bioinformatika merupakan suatu ilmu yang mengumpulkan dan

menganalisis kode-kode genetik (Wahyuni & Fuad, 2019). Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer diantaranya adalah panjang primer, *temperature melting* ( $T_m$ ), kandungan GC dan ikatan di ujung 3'. Primer yang baik berkisar antara 18-30 pasang basa. Primer yang memiliki panjang lebih dari 30 pasang basa akan menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik. Karakteristik kedua yang perlu diperhatikan dalam pemilihan primer adalah  $T_m$ . Primer yang baik memiliki selisih  $T_m$  sekitar 5°C. Hal ini ditujukan agar tidak terjadi penurunan pada proses amplifikasi. Prosentase antara basa G dan C juga perlu diperhatikan karena kandungan jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi  $T_m$  yang dimiliki suatu primer [11]. Primer yang baik mempunyai prosentase G dan C sekitar 40-60%. Kriteria lainnya untuk primer yang baik yaitu memiliki *self 3' complementarity* yang rendah agar tidak terjadi penempelan antar pasangan primer dan membentuk struktur yang disebut *hairpin* [12].

Dimer adalah struktur yang terbentuk diantara pasangan primer, dimana mereka bersatu karena memiliki basis yang saling melengkapi. Proses ini terjadi pada suhu penempelan yang sesuai, biasanya pada suhu rendah. Dengan melihat tahapan proses PCR, dapat dilihat bahwa penempelan primer pada DNA cetakan terjadi pada suhu annealing yang optimal. Proses ini dapat terjadi bersamaan dengan pembentukan dimer. Permasalahan yang mungkin muncul adalah primer mempunyai kecenderungan menempel satu dengan lainnya, dan bukan menempel pada DNA cetakan. Jika ikatan dimer ini terlalu kuat, akan mengganggu proses perpanjangan DNA dan akan menghasilkan konsentrasi DNA yang rendah. Dari analisis menggunakan DINAmelt, dapat dilihat bahwa primer membentuk dimer dengan dua ikatan GC. Ikatan antara basa G dan C adalah ikatan yang kuat karena terdiri dari 3 ikatan hydrogen. Hal itu akan membuat primer lebih mudah untuk disatukan (H. Saraswati, Seprianto, & Wahyuni, 2019).

Analisis *in silico* adalah prediksi komputasi penting dalam desain primer. Primer juga harus diuji melalui serangkaian optimasi di laboratorium. Optimasi kandidat primer melibatkan optimasi dalam suhu *annealing* ( $T_a$ ) menggunakan PCR gradient 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.

## **BAB 5. PENUTUP**

### **5.1. Kesimpulan**

Primer yang didesain dengan sekuen primer *cryI* forward 5'- CGGTGAATGCC CTGTTTACT-3' dan *cryI* reverse 5'- CGGTCTGGTTCCTATTGAT -3' berhasil mengamplifikasi gen *cryI* dengan ukuran sekitar 200 pasang basa.

### **5.2. Saran**

Perlu dilakukan optimasi suhu annealing untuk mendapatkan amplicon yang lebih spesifik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bahagiawati. (2003). Penggunaan *Bacillus Thuringiensis* sebagai biolarvasida. *Buletin AgroBio*, 5(1), 21–28.
- Bakri, Z. Hatta, M., & Massi, M. N. (2015). *Deteksi Keberadaan Bakteri Eschericia coli O157:H7 pada Feses Penderita Diare dengan Metode Kultur dan PCR*, *JST Kesehatan, Universitas Hasanuddin Makassar, ISSN 2252-5416*. 5(2), 184–192.
- Dagga, A., Aziz, M. A., Al Amnama, A. A., Al-Sharif, M., & El Hindi, M. (2016). Isolation and Molecular Characterization of Cry Gene for *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soil of Gaza Strip. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(4), 659–666.  
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.075>
- Dewi, R. W., Dewi, V. R., Yowani, S. C., & Yustiantara, P. S. (2018). Desain Primer untuk Amplifikasi Regio Promoter Gen inh A Isolat P016 Multidrug Resistance *Mycobacterium tuberculosis* dengan Metode Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(1), 34–39.
- Herman, M. (2002). Perakitan Tanaman Tahan Serangga Hama melalui Teknik Rekayasa Genetik. *Balai Penelitian Bioteknologi Dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor*, 5(1), 1–13.
- Jain, D., Sunda, S. D., Sanadhya, S., Nath, D. J., & Khandelwal, S. K. (2017). Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *3 Biotech*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0583-7>
- Nair, K., Al-Thani, R., Al-Thani, D., Al-Yafei, F., Ahmed, T., & Jaoua, S. (2018). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -Endotoxins and Cry gene content. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00708>
- Saraswati, H., Seprianto, & Wahyuni, F. D. (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.
- Saraswati, N. P. A. (2007). Deteksi dan Identifikasi Gen Cry4 pada Isolat *Bacillus thuringiensis* Daerah Bogor dan Sekitarnya. *Institut Pertanian Bogor, Bogor*.
- Suparman, Ahmad, H., & Ahmad, Z. (2016). Desain Primer PCR Secara in silico untuk Amplifikasi Gen COI pada Kupu-kupu *Papilio ulysses* Linnaeus dari Pulau Bacan. *Jurnal Pendidikan Matematika Dan IPA*, 7(1), 14–25.
- Suryanto, D. (2017). Amplifikasi gen Cry1 dan analisis genom isolat *Bacillus thuringiensis* lokal. *Journal of Biological Researches*, 15(1), 1–4.  
<https://doi.org/10.23869/bphjbr.15.1.20091>
- Wahyuni, F. D., & Fuad, A. M. (2019). Bioinformatics Analysis to Construct Cellulose-binding Module Synthetic Gene and Design Primer. *Bioedukasi*, XVII(1), 40–44.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.19184/bioedu.v17i1.13204>

Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*, 5(6), 110–113.  
Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/40018819470/>

gggul

Universitas  
**Esa Unggul**

Universitas  
**Esa Un**

gggul

Universitas  
**Esa Unggul**

Universitas  
**Esa Un**

gggul

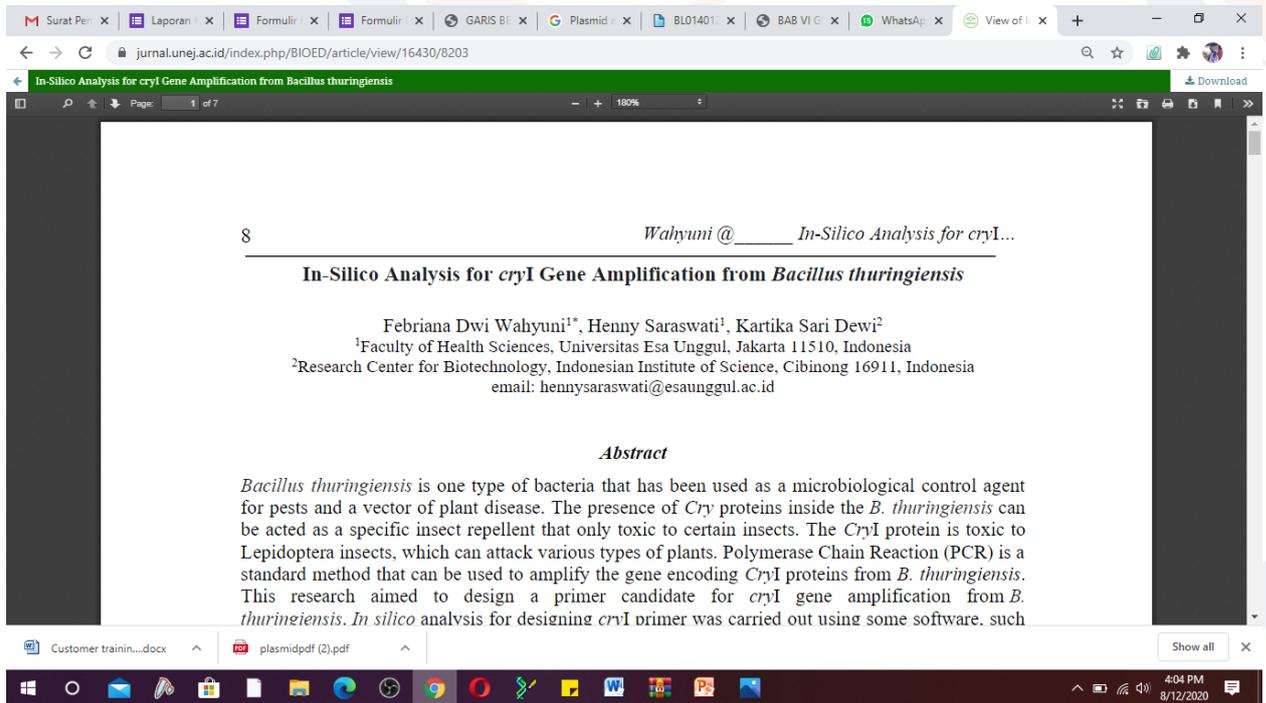
Universitas  
**Esa Unggul**

Universitas  
**Esa Un**

**Lampiran 1.** Sertifikat Diseminasi Hasil Penelitian di “International Conference on Biology, Sciences and Education” yang dilaksanakan di Padang pada 17-18 Oktober 2019



## Lampiran 2. Bukti Publikasi di Jurnal Bioedukasi (SINTA 3)



### Lampiran 3. Sertifikat HKI

  
**REPUBLIK INDONESIA**  
**KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA**

## SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201971084, 13 September 2019

**Pencipta**  
Nama : **Febriana Dwi Wahyuni**  
Alamat : **Jln. KH. Hasyim Ashari Taman Royal 2, Cluster Parahyangan 2 No 32, Tangerang, Tangerang, Banten, 15141**  
Kewarganegaraan : **Indonesia**

**Pemegang Hak Cipta**  
Nama : **Febriana Dwi Wahyuni**  
Alamat : **Jln. KH. Hasyim Ashari Taman Royal 2 Cluster Parahyangan 2 No 32, Tangerang, Tangerang, Banten, 15141**  
Kewarganegaraan : **Indonesia**

Jenis Ciptaan : **Karya Ilmiah**  
Judul Ciptaan : **Desain Primer Secara In Silico Untuk Amplifikasi Gen CryIII Dari Bacillus Thuringiensis Isolat Lokal Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : **31 Juli 2019, di Jakarta**

Jangka waktu perlindungan : **Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.**

Nomor pencatatan : **000154228**

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.  
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

  
Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001

