

**STUDI MORFOLOGI DAN KARAKTER KRISTAL PROTEIN ISOLAT**  
*Bacillus thuringiensis*

**(SKRIPSI)**

**Oleh**

**RACHMAT NUGRAHA INDRA**  
**NPM 1917021045**



**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS LAMPUNG**  
**2023**

**STUDI MORFOLOGI DAN KARAKTER KRISTAL PROTEIN ISOLAT**  
*Bacillus thuringiensis*

Oleh

**RACHMAT NUGRAHA INDRA**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
**SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi**  
**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS LAMPUNG**

**2023**

## ABSTRAK

### STUDI MORFOLOGI DAN KARAKTER KRISTAL PROTEIN ISOLAT *Bacillus thuringiensis*

Oleh

**RACHMAT NUGRAHA INDRA**

*Bacillus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang dan sering dimanfaatkan dalam bidang bioteknologi. Bakteri *Bacillus thuringiensis* (Bt) memiliki karakteristik yang berbeda dengan spesies *Bacillus* lain, yaitu dapat menghasilkan kristal protein yang bersifat toksik bagi serangga pada fase sporulasi. Kristal insektisida tersebut terdiri dari satu atau lebih protein kristal (Cry) dan sitolitik (Cyt), yang dikenal sebagai  $\delta$ -endotoksin. Spesifisitas dan aktivitas *Bacillus thuringiensis* terhadap inangnya dikaitkan dengan jenis dan bentuk  $\delta$ -endotoksin yang dihasilkan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui awal terbentuknya kristal protein pada waktu pertumbuhan bakteri serta karakter bentuk kristal protein dari enam isolat *Bacillus thuringiensis* yang diisolasi dari tanah Kebun Raya Liwa (KRL) Lampung. Metode penelitian yang digunakan adalah deskriptif kualitatif yang dipresentasikan dalam bentuk gambar dan tabel. Identifikasi morfologi kristal protein bakteri *Bacillus thuringiensis* selama fase sporulasi dilakukan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Sedangkan pengamatan waktu terbentuknya kristal dilakukan dengan metode pengecatan menggunakan *Comassie Brilliant Blue* dan *Crystal Violet* dengan interval waktu setiap tiga jam sekali selama 48 jam. Gambar hasil SEM menunjukkan bahwa setiap isolat memiliki lebih dari satu bentuk kristal protein dengan tujuh variasi morfologi kristal protein, yaitu *ovoid* (oval), *spherical* (bulat), bipiramidal segitiga, *rectangle* (empat persegi panjang), *elongate* (memanjang), *cuboid* (kotak), serta *geometrical*. Terbentuknya kristal protein pada keenam isolat menunjukkan waktu yang berbeda. Secara keseluruhan kristal protein sudah terlihat pada jam pertumbuhan ke-3 hingga ke-18. Waktu terbentuknya kristal tersebut dapat dijadikan sebagai referensi untuk pengujian aktivitas toksisitas isolat.

**Kata kunci :** *Bacillus thuringiensis*, kristal protein, morfologi, *Scanning Electron Microscope*, waktu terbentuknya kristal

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL STUDY AND CHARACTERISTICS OF PROTEIN CRYSTALS OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATE

By

**RACHMAT NUGRAHA INDRA**

*Bacillus* is a Gram-positive rod-shaped bacterium and is often used in the field of biotechnology. *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria can produce protein crystals that are toxic to insects during the sporulation phase. The insecticide crystals consist of one or more crystalline (Cry) and cytolytic (Cyt) proteins, which are known as  $\delta$ -endotoxins. The specificity and activity of *Bacillus thuringiensis* on the host are related to the type and form of the  $\delta$ -endotoxin produced. This research was conducted to determine the initial formation of protein crystals during bacterial growth and the character of the protein crystal shape of six isolates of *Bacillus thuringiensis* isolated from the soil of the Liwa Botanical Garden Lampung. The research method used is descriptive qualitative which is presented in the form of pictures and tables. Identification of the protein crystal morphology of *Bacillus thuringiensis* was carried out using a Scanning Electron Microscope (SEM). While observing the time of crystal formation was carried out by staining method using Comassie Brilliant Blue and Crystal Violet with intervals every three hours for 48 hours. SEM results show that each isolate has more than one protein crystal shape with seven variations of protein crystal morphology, namely ovoid, spherical, triangular bipyramidal, rectangular, elongate, cuboid, as well as geometrical. The formation of protein crystals in the six isolates showed different times. The time of protein crystals formation were seen at the 3rd to 18th hour of growth. These results can be used as a reference for testing the toxicity activity of isolates.

Keywords : *Bacillus thuringiensis*, morphology, protein crystal, Scanning Electron Microscope, time of crystal formation

Judul Skripsi : **STUDI MORFOLOGI DAN KARAKTER  
KRISTAL PROTEIN ISOLAT *Bacillus  
thuringiensis***

Nama Mahasiswa : **Rachmat Nugraha Indra**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1917021045

Program Studi : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

**Dr. Kusuma Handayani, M.Si.**  
NIP. 197808192008012018

Pembimbing II

**Rochmah Agustrina, Ph.D.**  
NIP. 196108031989032002

2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Unila

**Dr. Jani Master, S. Si., M. Si.**  
NIP. 198301312008121001

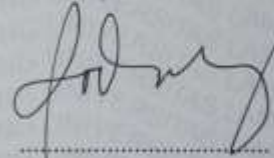
## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

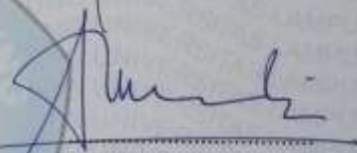
Ketua Penguji : Dr. Kusuma Handayani, M.Si.



Anggota Penguji : Rochmah Agustrina, Ph.D.



Penguji Utama : Prof. Dr. Sumardi, M.Si.



### 2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si, M.Si.  
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Juli 2023

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rachmat Nugraha Indra  
NPM : 1917021045  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, skripsi saya yang berjudul:

### **“STUDI MORFOLOGI DAN KARAKTER KRISTAL PROTEIN ISOLAT *Bacillus thuringiensis*”**

Bahwa keseluruhan dari karya ilmiah ini baik data, hasil analisis, maupun kajian ilmiahnya adalah **benar** hasil karya orisinal yang saya susun berdasarkan riset ilmiah melalui arahan komisi pembimbing dan pembahas. Karya ilmiah ini disusun dengan berpedoman pada norma serta etika akademik dan penulisan yang berlaku. Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila di kemudian hari terdapat pernyataan yang tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 07 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Rachmat Nugraha Indra  
NPM.1917021045

## RIWAYAT HIDUP



Penulis memiliki nama lengkap Rachmat Nugraha Indra, dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 23 September 2001. Penulis merupakan anak kedua dari pasangan Bapak Indra dan Ibu Suparmi dengan tiga saudara kandung. Penulis mulai menempuh pendidikan di Taman Kanak-Kanak (TK) Dwi Tunggal pada tahun 2006-2007, dilanjutkan ke jenjang Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Sumberejo Kemiling pada tahun 2008-2013. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan menengah di Madrasah

Tsanawiyah (MTs) Negeri 1 Bandar Lampung pada tahun 2013-2016 dan menempuh jenjang yang lebih tinggi di Sekolah Menengah Atas (SMA) Kebangsaan Adhigana Nusantara Lampung pada tahun 2016-2019. Setelah lulus pada tahun 2019, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama berkuliah di dunia perkuliahan, penulis telah berpartisipasi aktif dalam organisasi kemahasiswaan dan menjadi salah satu anggota Bidang Ekspedisi di Himpunan mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Universitas Lampung periode 2020 dan naik menjabat sebagai sekretaris Bidang Ekspedisi pada periode 2021. Pada tahun yang sama, penulis tergabung pula sebagai anggota Departemen Riset dan Penalaran UKM Penelitian Universitas Lampung. Penulis juga berperan aktif sebagai asisten Laboratorium Mikrobiologi selama tiga tahun perkuliahan dengan



praktikum yang diampu meliputi Mikrobiologi Umum dan Fisiologi Mikroba pada tahun 2020 - 2023, serta Bioteknologi pada tahun 2023. Pada bulan Januari - Februari 2022, penulis melaksanakan Kerja Praktik (KP) di Laboratorium Mikrobiologi Balai Standardisasi dan Pelayanan Jasa Industri (BSPJI) Bandar Lampung dengan melakukan analisis parameter mikrobiologi dari beragam sampel industri. Kegiatan tersebut menghasilkan karya ilmiah berupa laporan kerja praktik yang berjudul “**Pengujian Kapang Pada Berbagai Sampel Tepung Tapioka di Provinsi Lampung**” dan telah terbit pada prosiding nasional. Pada tahun yang sama, penulis melaksanakan salah satu Tri Dharma Perguruan Tinggi, yakni Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Pekon Sukabandung, Kecamatan Talang Padang, Kabupaten Tanggamus pada Bulan Juni – Agustus.

Selain aktif secara akademik dan berorganisasi, penulis memiliki berbagai pengalaman dan capaian seperti menjadi narasumber, mengikuti kompetisi, dan memperoleh beasiswa. Kompetisi prestisius yang pernah diraih penulis adalah menjadi penerima hibah pendanaan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) pada tahun 2020 dan 2021 oleh Kemenristekdikbud serta tampil pada Pekan Ilmiah Mahasiswa Nasional (PIMNAS) pada tahun 2020 dengan bidang riset mikrobiologi. Dari capaian tersebut, penulis membagikan ilmu dan pengalamannya dengan menjadi narasumber di berbagai pematieran dan workshop. Sebagai seorang biolog, penulis kerap aktif dalam isu lingkungan dengan tergabung dalam panitia Pekan Konservasi Sumber Daya Alam pada tahun 2021 sebagai koordinator aksi lingkungan yang berfokus pada konservasi kukang sumatra, dan pernah menjadi delegasi pada *Lampung Youth Ecopreneur Summit* 2022. Selain itu, penulis pernah berkesempatan untuk menjadi *awardee* Beasiswa Inovator Muda Nusantara (IMN) oleh Yayasan Masjid Salman Institut Teknologi Bandung dengan karya yang diusung adalah Bioinsektisida dari Cendawan Entomopatogen dan berkesempatan untuk bertemu serta bersaing dengan para inovator muda lainnya dari Perguruan Tinggi se-Indonesia di Bandung.

## **PERSEMBAHAN**

*Alhamdulillahirabbilamin. Segala puji dan syukur kepada Allah Swt. atas segala rahmat dan karunianya yang telah memberikan segala kenikmatan, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya. Saya dengan segenap hati dan penuh rasa syukur mempersembahkan karya ini kepada:*

*Kedua orangtua yang sangat saya cintai dan sangat saya banggakan, Bapak Indra dan Ibu Suparmi. Sesungguhnya ini adalah salah satu bentuk keberhasilan kedua orangtua saya. Dengan segala kesederhanaan, doa-doa, keringat, dan air mata senantiasa memperjuangkan masa depan saya hingga mengantarkan putranya ini meraih gelar Sarjana Sains (S.Si.);*

*Kakak yang telah menjadi panutan dan turut mendukung perjalanan saya untuk berkuliah, Nindy Claudia Avista, S.Ak. Adik-adik yang saya sayangi, yang telah menjadi motivasi bagi saya untuk membenahi diri dan menjadi seorang yang sukses agar kelak dapat menjadi sosok teladan terbaik;*

*Orang-orang yang telah hadir dan memberikan saya pelajaran kehidupan;*

*Almamater tercinta, Universitas Lampung.*

## MOTTO

"Boleh jadi kamu membenci sesuatu namun ia amat baik bagimu dan boleh jadi engkau mencintai sesuatu namun ia amat buruk bagimu, Allah Maha Mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui." (Q.S Al Baqarah: 216)

“Barangsiapa yang mengerjakan kebaikan sekecil apapun, niscaya dia akan melihat (balasan) nya.” (Q.S Al-Zalzalah: 7)

“Sesungguhnya pertolongan akan datang bersama kesabaran.” (HR. Ahmad)

“Orang yang hebat adalah orang yang memiliki kemampuan menyembunyikan kesusahan, sehingga orang lain mengira bahwa ia selalu senang.” (Imam Syafi’i)

“Hidup ini adalah petualangan. Semua orang memiliki petualangannya masing – masing, maka jadilah seorang petualang yang melakukan hal terbaik.” (Tere Liye)

“Sungguh tidak ada mawar yang tumbuh di tegarnya karang.” (Tere Liye)

*“Some people come in your life as blessings. Some come in your life as lessons.”*  
(Mother Teresa)

## SANWACANA

*Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.*

Segala puji hanya bagi Allah Swt. Tuhan semesta alam Yang Mahapemurah, karena atas limpahan rahmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “**Studi Morfologi dan Karakter Kristal Protein Isolat *Bacillus thuringiensis***” dengan baik dan tepat pada waktunya.

Skripsi ini menjadi saksi bisu perjuangan penulis dalam proses menuntut ilmu sekaligus penerapannya secara langsung melalui penelitian dan penulisan karya ilmiah. Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih yang begitu tulus kepada:

1. Kedua orang tua tercinta Bapak Indra dan Ibu Suparmi yang selalu memberikan motivasi, inspirasi, kasih sayang, doa dan perjuangan luar biasa serta menjadi alasan bagi penulis untuk tidak pernah lelah berjuang;
2. Mbak Nindy dan adik-adikku tersayang yang kehadirannya menjadi pemantik api semangat dan pikiran positif dikala menghadapi masa sulit;
3. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
4. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
5. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
6. Bapak Drs. Tugiyono, M.Si., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan dan bantuannya kepada penulis selama berada di bangku perkuliahan;

7. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing I yang telah membimbing dengan tulus, mengayomi dengan sabar, memberikan masukan yang baik, tempat bercerita dan berkeluh kesah, serta memberikan dukungan pendanaan selama menjalankan penelitian;
8. Mendiang Ibu Dra. Christina Nugroho Ekowati selaku Pembimbing II pada proses awal hingga menjelang akhir pelaksanaan penelitian, terimakasih atas ilmu praktik mikrobiologi yang telah diberikan dan selalu mengajarkan penulis agar menjadi seorang yang sabar dan tekun;
9. Ibu Rochmah Agustrina, Ph.D. selaku Pembimbing II yang telah memberikan arahan, saran, dan masukan yang membangun dengan penuh kesabaran kepada penulis;
10. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si. selaku Dosen Penguji yang selalu menanamkan pemahaman konsep luar biasa atas praktik ilmu mikrobiologi, perlakuan yang benar dan kejujuran dalam menjalankan proses penelitian;
11. Seluruh Bapak/Ibu dosen Jurusan Biologi atas ilmu yang telah diberikan selama mengikuti perkuliahan;
12. Bapak Prof. Dr. Sumardi, MSi. selaku Kepala Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung atas izin penelitian yang telah diberikan;
13. Mba Oni Mastuti, S.Si selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Lampung atas dedikasi dan kepeduliannya yang luar biasa kepada seluruh peneliti mikrobiologi selama bertugas, saran dan masukan, doa-doa, motivasi, hal positif, dan semangat yang selalu diberikan untuk penulis;
14. Sahabat seperjuangan selama proses perkuliahan, Pedjuang - *Fantastic Four*: Muhammad Rian Hidayat, S.Si, Alvian Firmansah, S.Si., dan Raihan Adhiyatma Atalla S.Si., yang selalu memberikan dorongan semangat, uluran tangan tulus, berbagi suka duka, berbagi pengalaman dan bertukar ilmu secara langsung;

15. Seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2019 yang selalu membagikan cerita dan pengalamannya sehingga menjadi motivasi tersendiri bagi penulis untuk selalu belajar dan mengejar ketertinggalan;
16. Kakak-kakak tingkat yang telah menjadi tempat bertanya, dan adik-adik tingkat yang telah mendoakan kesuksesan serta kelancaran dalam melaksanakan proses pengerjaan skripsi;
17. Seluruh pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu atas bantuan yang telah diberikan, sehingga perjalanan penulisan skripsi ini diberikan kelancaran;
18. Terimakasih untuk diri yang telah mencapai titik ini, mampu berjalan sendirian untuk menghadapi banyak hal, berjuang sejauh ini hingga melampaui zona nyaman, berani melawan ketakutan, berani mengambil keputusan, berani mengambil langkah yang tepat, teguh atas pendirian, selalu memiliki keyakinan serta pemikiran positif atas masa depan, dan ridho akan apa yang sudah ditakdirkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesalahan dan jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis akan dengan senang hati menerima kritik, saran, dan masukan yang membangun agar menjadi evaluasi dan perbaikan kedepannya sehingga skripsi ini dapat berguna serta bermanfaat bagi kita semua, Aamiin.

Bandarlampung, 07 Agustus 2023

Penulis,



Rachmat Nugraha Indra

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xviii</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan .....	3
1.3 Kerangka Pemikiran.....	3
1.4 Hipotesis .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	5
2.2 Kristal Protein .....	8
2.3 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	10
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	13
3.2 Alat dan Bahan.....	13
3.3 Metode .....	14
3.4 Peremajaan Isolat <i>Bacillus</i> sp. ....	14
3.5 Validasi Kemurnian Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	15
3.6 Deteksi dan Pewarnaan Morfologi Kristal Protein .....	16
3.6.1 Pembuatan Larutan <i>Coomassie Brilliant Blue</i> (CBB) .....	16
3.6.2 Pewarnaan Kristal Protein .....	16
3.7 Penentuan Waktu Terbentuknya Kristal Protein.....	17
3.8 Pengambilan Gambar <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) .....	17
3.9 Analisis Deskriptif .....	17
3.10 Diagram Alir Penelitian .....	18

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>19</b>
4.1 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	19
4.2 Deteksi Keberadaan Kristal Protein.....	24
4.3 Bentuk Kristal Protein yang Diamati dengan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	26
4.4 Waktu Terbentuknya Kristal Protein .....	31
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>37</b>
5.1 Simpulan .....	37
5.2 Saran .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>45</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pengamatan Morfologi Secara Mikroskopik .....	21
2. Variasi Bentuk Kristal Isolat <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	27
3. Hasil Pengamatan Waktu Terbentuknya Kristal Protein .....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kenampakan Kristal Pada Mikroskop Fase Kontras .....	6
2. Pengamatan Spora dan Kristal Pada SEM .....	9
3. Diagram Alir Penelitian .....	18
4. Koloni Murni yang Tumbuh Pada Media Agar Miring .....	19
5. Kristal Protein yang Ditemukan Pada Isolat Bt 2. ....	24
6. Kristal Protein yang Ditemukan Pada Isolat Bt 7. ....	25
7. Hasil SEM Pada Isolat Bt 2.....	28
8. Hasil SEM Pada Isolat Bt 3.....	29
9. Hasil SEM Pada Isolat Bt 4.....	29
10. Hasil SEM Pada Isolat Bt 5.....	30
11. Hasil SEM Pada Isolat Bt 6.....	30
12. Hasil SEM Pada Isolat Bt 7.....	31
13. Gambar SEM Pembanding Dari Bentuk Kristal Protein .....	32
14. Pembentukan Kristal Protein Isolat Bt 2.....	35
15. Koloni Murni yang Tumbuh Pada Media Agar Miring .....	45

16. Hasil Penanaman Isolat Pada Media Selektif .....	46
17. Kristal Protein yang Ditemukan Pada Isolat .....	47
18. Pembentukan Kristal Protein Isolat.....	47
19. Instrumen <i>Scanning Electron Microscope</i> .....	47
20. Proses Tahapan Metode Penelitian .....	47

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Bacillus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang, sering digunakan dalam bidang bioteknologi karena memiliki beragam kemampuan fisiologis. Selain itu *Bacillus* menunjukkan kemampuan unik, yaitu mampu bereplikasi dengan cepat, mentolerir kondisi lingkungan yang merugikan, serta bertindak sebagai kontrol biologis. *Bacillus* mampu menghasilkan endospora secara intraseluler dengan beragam bentuk seperti bulat, oval, elips atau silinder (Siallagan *et al.*, 2020). Endospora dibentuk *Bacillus* sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan sehingga mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan yang berubah-ubah. *Bacillus thuringiensis* (Bt) dapat menghasilkan protein kristal yang memiliki aktivitas sebagai insektisida selama fase stasioner dan sporulasi dari siklus pertumbuhannya. Selama sporulasi, Bt dapat menghasilkan satu atau lebih kristal insektisida parasporal yang terdiri dari satu atau lebih protein kristal (Cry) dan sitolitik (Cyt), yang dikenal sebagai endotoksin (Palma *et al.*, 2014) dan bersifat spesifik terhadap ordo serangga tertentu (Akhtar *et al.*, 2021).

Kristal endotoksin (protoksin) bila tertelan oleh serangga akan terlarut karena keadaan pH basa pada usus tengah serangga dan berubah menjadi toksin akibat adanya protease. Toksin tersebut bersifat sebagai racun aktif yang menyebabkan terbentuknya pori-pori pada dinding usus sehingga terjadi kerusakan parah dan kematian pada serangga target (Jacups *et al.*, 2013). Semua protein insektisida Bt dilaporkan tidak memiliki efek negatif pada hewan, manusia, tumbuhan, dan bakteri menguntungkan lainnya

(Liu *et al.*, 2021) sehingga pemanfaatannya di bidang bioteknologi seperti pengendalian hayati sangat potensial. Spesifisitas *Bacillus thuringiensis* terhadap inangnya dikaitkan dengan jenis dan bentuk dari  $\delta$ -endotoksin yang dihasilkan selama fase sporulasi (Mukhija & Khanna, 2018).

Kristal protein pada *Bacillus thuringiensis* dikelompokkan berdasarkan bentuknya yang menentukan spesifitasnya terhadap serangga. Kristal protein berbentuk bulat ditemukan pada subspecies *israelensis* yang memiliki aktivitas toksisitas terhadap Diptera. Kristal protein bentuk pipih empat persegi panjang (*flat rectangular*) terdapat pada subspecies *tenebriosis*, toksik terhadap Coleoptera. Kristal protein bentuk kubus toksik terhadap Diptera tertentu dan Lepidoptera. Sedangkan kristal protein dengan bentuk bipiramidal segitiga terdapat pada subspecies *kurstaki* toksik terhadap Lepidoptera (Addiniyah, 2019). Pendapat yang serupa tentang kristal protein yaitu Mafazah & Zulaika, (2017) yang menyebutkan bahwa bentuk kristal protein beranekaragam dan bentuk tersebut berkorelasi dengan daya toksisitasnya. Kristal protein berbentuk bipiramidal segitiga toksik terhadap Ordo Lepidoptera, sedangkan kristal protein yang toksik terhadap Diptera berbentuk kubus, oval dan amorf. Perbedaan distribusi morfologi protein kristal dapat disebabkan oleh adanya variasi genetik sebagai akibat pengaruh kondisi lingkungan atau habitat yang berbeda, serta komposisi protoksinnya.

Hasil penelitian Janah *et al.* (2022) pada isolasi bakteri dari tanah Kebun Raya Liwa (KRL) Lampung diperoleh tujuh isolat *Bacillus*. Namun, dari ketujuh isolat tersebut belum diketahui karakter kristal proteinnya, sehingga perlu dilakukan karakterisasi *Bacillus thuringiensis*. Setiap morfologi kristal dapat dibentuk oleh strain *Bacillus thuringiensis* yang berbeda, sehingga dapat dipastikan apakah terdapat perbedaan dalam struktur kristal pada sampel yang mungkin dapat menjelaskan perbedaan tertentu dalam hal toksisitasnya. Disebutkan oleh Mukhija & Khanna, (2018) bahwa mengamati protein kristal parasporal selama fase sporulasi dapat dilakukan dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) yang merupakan metode paling langsung dan efektif untuk

mengidentifikasi bakteri *Bacillus thuringiensis*, sehingga bentuk dari kristal protein pada isolat target dapat teramati dengan jelas dan representatif.

## 1.2 Tujuan

1. Menentukan karakter keenam isolat *Bacillus thuringiensis* berdasarkan pengecatan Gram dan kristal protein;
2. Mengetahui bentuk dan jumlah variasi kristal protein yang dihasilkan pada enam isolat *Bacillus thuringiensis*;
3. Mengetahui waktu terbentuknya kristal protein pada keenam isolat.

## 1.3 Kerangka Pemikiran

*Bacillus thuringiensis* (Bt) adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, dan memiliki kemampuan menghasilkan kristal protein yang bersifat toksin bagi serangga selama masa sporulasi. Toksisitas kristal protein bersifat spesifik untuk serangga, nematoda target, dan tidak berbahaya bagi musuh alami dan organisme bukan sasaran serta dapat ditingkatkan patogenitasnya melalui rekayasa genetik. Dengan kelebihan yang dimiliki tersebut, *B. thuringiensis* dikenal sebagai agensia bahan baku pestisida dalam bidang pertanian yang ramah lingkungan dan aman bagi kesehatan.

Morfologi kristal protein pada *Bacillus thuringiensis* berbeda-beda tergantung pada subspeciesnya. Perbedaan morfologi kristal protein menentukan toksisitas dan spesifitasnya terhadap serangga. Kristal protein berbentuk bulat ditemukan pada subspecies *israelensis*, memiliki aktivitas toksin bagi Diptera, kristal protein berbentuk pipih empat persegi panjang (*flat rectangular*) terdapat pada subspecies *tenebriosis* yang toksik bagi Coleoptera, kristal protein berbentuk kubus toksik bagi Diptera tertentu dan Lepidoptera, sedangkan kristal protein berbentuk piramida toksik bagi Lepidoptera. Perbedaan bentuk kristal tersebut dipengaruhi oleh komposisi protoksinnya. Kristal bipiramidal dibentuk oleh Cry1, bentuk kubus oleh Cry2, bentuk

persegi panjang datar dibentuk oleh Cry3A, bentuk tidak beraturan dibentuk oleh Cry3B, bentuk bulat oleh Cry4A dan Cry4B, serta bentuk belah ketupat dibentuk oleh Cry11A. Beragam bentuk tersebut menunjukkan kemampuan protoksin yang beragam untuk mengkristal yang dapat menurunkan kerentanannya terhadap degradasi proteolitik dini. Struktur dan karakteristik kelarutan kristal bergantung pula pada faktor-faktor seperti struktur sekunder protoksin, energi ikatan disulfida, dan adanya tambahan komponen spesifik *Bacillus thuringiensis*. Dari informasi tersebut, diperoleh bahwasannya setiap strain *Bacillus thuringiensis* membentuk kristal protein yang berbeda, sehingga dihasilkan protoksin yang berbeda pula. Penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk menentukan karakter kristal protein pada enam isolat *Bacillus thuringiensis* dari Kebun Raya Liwa (KRL) Lampung.

#### **1.4 Hipotesis**

1. Keenam isolat yang diamati memiliki persamaan sifat Gram dan mampu menghasilkan kristal protein;
2. Isolat *Bacillus thuringiensis* yang digunakan memiliki perbedaan bentuk kristal protein yang menentukan aktivitas toksisitasnya terhadap serangga;
3. Terdapat perbedaan waktu produksi kristal protein pada enam isolat *Bacillus thuringiensis* yang digunakan.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

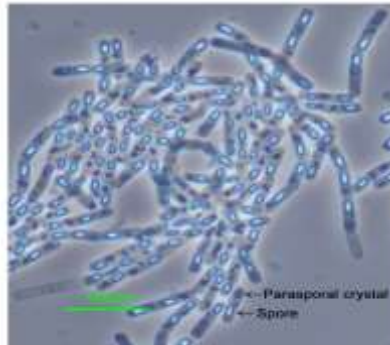
### 2.1 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) merupakan bakteri berbentuk batang berukuran 3-5  $\mu\text{m}$ , bersifat anaerob fakultatif (dapat berkembang biak dengan sedikit atau tanpa oksigen), memiliki sifat Gram positif yaitu mampu menyerap warna kristal violet saat dilakukan pewarnaan Gram karena memiliki lapisan peptidoglikan tebal pada dinding sel. *B. thuringiensis* membentuk protein dengan karakteristik menyerupai endospora berbentuk oval hingga silindris, terletak parasentral atau terminal, dapat bersifat non motil (tidak dapat bergerak) dan motil (bergerak) dengan adanya flagela tipe peritrik, yaitu flagela berjumlah banyak dan berada di sekeliling tubuh. *B. thuringiensis* yang diinokulasi pada medium padat akan membentuk koloni berbentuk bulat dengan tepian berkerut, berdiameter 5-10 mm, berwarna putih, elevasi timbul serta permukaan koloni kasar (Lantang & Runtuboi, 2018).

Bakteri ini pertama kali ditemukan tahun 1901 oleh bakteriolog Jepang Ishiwata Shigetane pada larva ulat sutera yang sakit (*Bombyx mori*) dan dicirikan oleh keberadaan protein  $\delta$ -endotoksin insektisida yang diproduksinya. Bakteri ini memiliki siklus kehidupan yang sederhana, dimana ketika kondisi lingkungan serta pasokan nutrisi sesuai maka spora akan berkecambah dan membentuk sel vegetatif. Namun, jika satu atau lebih senyawa nutrisi seperti karbohidrat, oksigen, asam amino atau lainnya tidak mencukupi, bakteri ini akan membentuk badan paraspora



bersama dengan spora dan delta endotoksin (Gambar 1) (Yilmaz *et al.*, 2017). *Bacillus thuringiensis* terdiri dari sejumlah besar subspecies atau varietas dan galur-galur (*strains*) yang ditemukan hampir pada semua ekosistem termasuk tanah, air, serangga mati, debu, daun dari pohon gugur, beragam tumbuhan konifer, mamalia pemakan serangga serta dari jaringan manusia dengan nekrosis parah.



**Gambar 1.** Kenampakan kristal paraspora yang diamati dengan mikroskop fase kontras perbesaran 1000x (Wang *et al.*, 2013).

*Bacillus thuringiensis* dikenal sebagai agensia bahan baku pestisida yang baik dalam pertanian dan aman terhadap kesehatan serta ramah lingkungan. Sifat ramah lingkungan tersebut dikarenakan protein kristal yang diisolasi dari *B. thuringiensis* mempunyai target yang spesifik sehingga tidak mematikan serangga yang bukan sasaran dan mudah terurai, tidak menumpuk serta mencemari lingkungan (Hermanto *et al.*, 2013). *B. thuringiensis* adalah salah satu produk mikroba paling aman yang diketahui. Dengan keunggulan unik tersebut, *B. thuringiensis* telah digunakan di seluruh dunia selama bertahun-tahun sebagai biopestisida yang ramah lingkungan untuk mengendalikan serangga yang mempengaruhi pertanian dan kesehatan masyarakat (Wang *et al.*, 2013).

Kemampuan dan efektivitas *B. thuringiensis* dalam pengendalian hama serangga telah banyak dibuktikan seperti yang dilaporkan oleh (Rini *et al.*, 2018) mengenai kematian *Periplaneta americana* dan *Beauveria germanica*. Kedua serangga tersebut memiliki ciri morfologi tubuhnya berwarna hitam

gelap, basah dan lembek sehingga mudah hancur serta mengeluarkan bau busuk. Ciri morfologi kematian tersebut dikarenakan pengaruh racun perut yang ditimbulkan oleh isolat bakteri *B. thuringiensis* yang merusak usus bagian tengah sehingga mengganggu proses metabolisme serangga tersebut. Penelitian lain menerangkan bahwa *B. thuringiensis* terbukti berpengaruh terhadap mortalitas larva *Spodoptera litura* dimana mortalitas tertinggi terjadi pada larva instar 5 (Mafazah & Zulaika, 2017).

Bioinsektisida yang diproduksi dari *Bacillus thuringiensis* merupakan 90–95% dari bioinsektisida yang dikomersialkan untuk digunakan oleh petani di berbagai negara. Dengan kemajuan teknologi, gen insektisidal *B. thuringiensis* telah dapat diisolasi dan diklon sehingga membuka kemungkinan untuk diintroduksi ke dalam tanaman. Produksi bioinsektisida berkembang dengan cepat dan diperkirakan mencapai 11% per tahun. Beberapa subspecies dari bakteri *B. thuringiensis*, yaitu : Kurstaki, Aizawai, Sotto, Entomocidus, Berliner dan Israelensis. Dalam satu subspecies *B. thuringiensis* dijumpai beberapa jenis strain seperti HD-1, dan HD-5 (Wahyuni & Wirawan, 2017). Strain HD-1 adalah salah satu strain yang paling banyak dipelajari karena dicirikan oleh terdapat berbagai gen Cry anti-Lepidoptera, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab, dan Cry1Ia. Sejak awal penemuannya, prospek produk berbasis *B. thuringiensis* telah berkembang dan masih menjadi suatu keberhasilan komersial mikroba untuk pengendalian hama (Fernández-chapa *et al.*, 2019). Bakteri pada umumnya dikelompokkan dalam susunan taksonomi untuk mempermudah penggolongan berdasarkan kemiripannya. *Bacillus thuringiensis* dikelompokkan dalam klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Eubacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

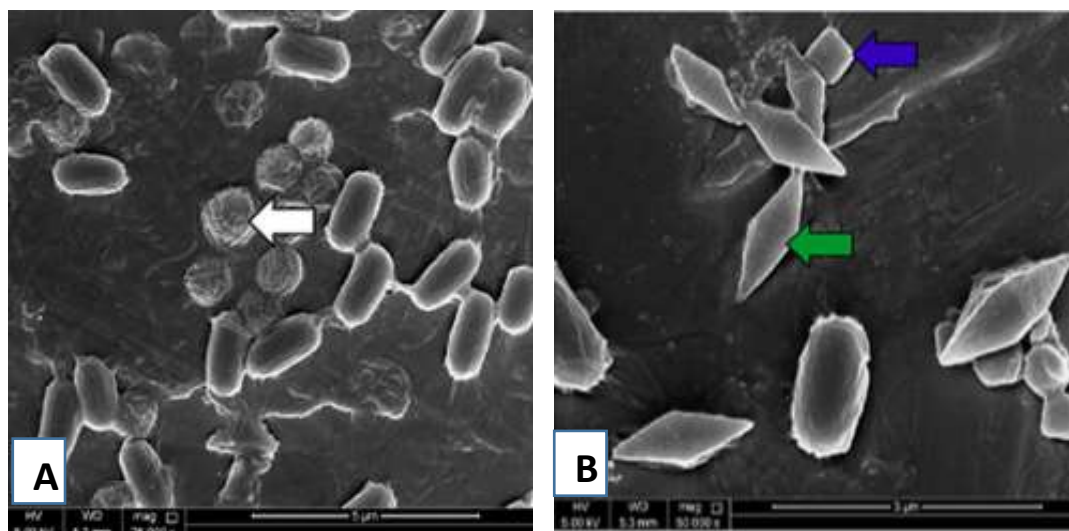
Spesies : *Bacillus thuringiensis* (Wahyuni & Wirawan, 2017).

## 2.2 Kristal Protein

Dilihat dari sifat morfologi maupun fisiologinya, *Bacillus thuringiensis* memiliki persamaan dengan *Bacillus cereus*. Adapun yang membedakannya adalah keberadaan kristal protein yang bersifat toksin terhadap serangga. Protein toksin ini pertama kali dikenal sebagai *parasporal crystalline inclusion* selanjutnya disebut sebagai  $\delta$ -endotoksin atau *Insecticidal Crystal Protein* (ICP) yang dibagi dalam dua kategori protein, yaitu protein Cry (*Crystal*) dan protein Cyt (*Cytolytic*) (Sauka, 2017). Protein Cry yang membentuk kristal dan toksin terhadap serangga ini bersifat *soluble* dan termasuk dalam kelompok  $\delta$ -endotoksin bakteri. Selama sporulasi, bakteri entomopatogen *Bacillus thuringiensis* membentuk kristal paraspora yang terdiri dari protein kristal insektisida (ICPs) yang biasanya mewakili hingga 25% massa kering sel dari sel yang bersporulasi. Sporulasi pada *B. thuringiensis* dicirikan oleh tujuh tahap, yaitu tahap 0 sampai I pembentukan filamen aksial ; tahap II pembentukan septum forespora dan pembelahan sel asimetris; tahap III *engulfment*, pembentukan forespora, dan kemunculan pertama kristal paraspora; tahap IV sampai VI pembentukan korteks, mantel, dan eksosporium serta perkembangan kristal paraspora; dan tahap VII pematangan spora dan lisis sel induk serta pelepasan kristal spora dan paraspora. Spektrum aktivitas insektisida ICP mencakup 12 ordo serangga (termasuk Lepidoptera, Diptera, dan Coleoptera), nematoda, dan bahkan sel kanker manusia (Wang *et al.*, 2013).

Kristal endotoksin *Bacillus thuringiensis* telah dikelompokkan menjadi tujuh kelas utama dimana pengetahuan tentang mekanisme cara kerja dari endotoksin ini penting untuk menentukan proses kunci yang bertanggungjawab terhadap spesifikan dari kristal protein. Faktor utama yang menentukan kisaran inang dari kristal protein adalah perbedaan pada *midgut* larva yang mempengaruhi proses kelarutan dan perubahan kristal dari tidak aktif menjadi aktif pada spesies - spesies serangga (Wahyuni & Wirawan, 2017). Kristal protein pada *Bacillus thuringiensis* dapat

digolongkan berdasarkan bentuknya. Kristal protein dengan bentuk bulat ditemukan pada subspecies *Israelensis* yang memiliki aktivitas toksisitas terhadap Diptera, kristal protein bentuk pipih empat persegi panjang (*flat rectangular*) terdapat pada subspecies *Tenebriosis* yang toksik terhadap Coleoptera, kristal protein bentuk kuboid (Gambar 2) toksik terhadap Diptera tertentu dan Lepidoptera, sedangkan kristal protein dengan bentuk bipiramidal (Gambar 2) pada subspecies *Kurstaki* toksik terhadap Lepidoptera (Addiniyah, 2019).



**Gambar 2.** Pengamatan spora dan kristal strain *B. thuringiensis* pada *Scanning Electron Microscopy* (SEM). A. Panah putih menunjukkan bentuk kristal *spherical* ; B. Panah hijau menunjukkan bentuk kristal bipiramidal dan panah biru bentuk kristal kuboid (Al-thani *et al.*, 2022)

Parasporal kristal *Bacillus thuringiensis* yang masuk ke dalam tubuh serangga uji akan melewati saluran pencernaan serangga. Kristal protein akan teraktivasi oleh lingkungan basa di dalam saluran pencernaan menjadi protein  $\delta$ -endotoksin atau protoksin. Protoksin akan menjadi toksin apabila teraktivasi oleh enzim protease serangga dan terikat secara spesifik pada reseptor di saluran pencernaan (Schünemann *et al.*, 2014). Toksin Cry yang menempel pada peritropik membran dapat melukai hingga menyebabkan

kebocoran sitoplasma sehingga menyebabkan kematian. Variasi dalam komponen Cry kristal menggarisbawahi variasi dalam spektrum aktivitas strain. Sejauh ini, 73 Cry dan tujuh keluarga Cyt terdaftar di database nomenklatur *Bacillus thuringiensis* yang telah diperbarui. Setiap keluarga Cry memiliki bentuk khas dan spektrum aktivitas seperti protein famili Cry1 yang membentuk kristal bipiramidal dan aktif melawan larva Lepidoptera serta Cry4 membentuk kristal bulat yang beracun bagi larva Diptera. Semua protein insektisida *Bacillus thuringiensis* yang telah dilaporkan tidak memiliki efek pada hewan, manusia, tumbuhan serta bakteri menguntungkan lainnya sehingga aman dan banyak digunakan sebagai biopestisida (Liu *et al.*, 2021). Protein Cry umumnya membentuk inklusi kristal di kompartemen sel induk. Kristal paraspora ini memiliki bentuk yang berbeda tergantung pada sifat  $\delta$  - endotoksin dan gen yang sesuai. Perbedaan bentuk kristal bergantung pada komposisi protoksinnya, seperti bipiramidal yang dibentuk oleh Cry1, bentuk kubus oleh Cry2, persegi panjang datar oleh Cry3A, tidak beraturan oleh Cry3B, bulat oleh Cry4A dan Cry4B, dan belah ketupat oleh Cry11A. Hal tersebut merupakan kemampuan protoksin untuk mengkristal dapat menurunkan kerentanannya terhadap degradasi proteolitik dini. Struktur dan karakteristik kelarutan kristal tergantung pula pada faktor-faktor seperti struktur sekunder protoksin, energi ikatan disulfida, dan adanya tambahan komponen spesifik *B. thuringiensis*. Tingkat kristal yang disintesis oleh bakteri tergantung pada ekspresi gen penyandi (Wang *et al.*, 2013).

### **2.3 Scanning Electron Microscope (SEM)**

*Scanning Electron Microscope* (SEM) adalah salah satu jenis mikroskop elektron yang menggambar spesimen dengan memindainya menggunakan sinar elektron berenergi tinggi dalam *scan* pola raster. Elektron memiliki resolusi yang lebih tinggi daripada cahaya. Cahaya hanya mampu mencapai 200 nm sedangkan elektron bisa mencapai resolusi sampai 0.1 – 0.2 nm. Elektron berinteraksi dengan atom-atom sehingga spesimen menghasilkan

sinyal yang mengandung informasi tentang topografi permukaan spesimen, komposisi, dan karakteristik lainnya seperti konduktivitas listrik. Mikroskop elektron dapat menghasilkan perbesaran hingga dua juta kali, mikroskop elektron memiliki resolusi yang lebih besar dibanding mikroskop cahaya atau mikroskop optik. SEM umumnya digunakan untuk melihat objek yang sangat kecil (skala nano), diantaranya untuk mengidentifikasi material, pada bidang material sains, forensik, analisis kegagalan metalurgi dan elektronik, ilmu korosi, batuan mineral, perangkat nano, polimer, katalis, desain semikonduktor, serta pertambangan minyak dan gas. *Image* (citra) yang dihasilkan dari SEM berupa gambar hitam putih (tanpa warna), hal ini disebabkan karena panjang gelombang yang dihasilkan oleh *electron probe* (elektron pemindai) tidak berada pada spektrum cahaya tampak (Masta, 2020).

Secara garis besar, instrumen SEM terdiri dari beberapa perangkat, perangkat – perangkat tersebut dapat dikategorikan dalam tiga komponen, yaitu komponen pemindai, komponen penyajian gambar dan data (*image display*), serta komponen pendukung.

Peralatan utama yang terdapat pada SEM diantaranya adalah:

1. Pistol elektron, umumnya berupa filamen yang terbuat dari unsur yang mudah untuk melepaskan elektron, misal tungsten;
2. Lensa untuk elektron, berupa lensa bersifat magnetis karena elektron yang bermuatan negatif dapat dibelokkan oleh medan magnet;
3. Sistem vakum, karena elektron sangat kecil dan ringan maka jika ada molekul udara lain, elektron yang berjalan menuju sasaran akan terpecah oleh tumbukan sebelum mengenai sasaran sehingga menghilangkan molekul udara menjadi sangat penting (Wijayanto & Bayuseno, 2014).

Disarikan dari (Mukhija & Khanna, 2018), prinsip kerja dari SEM adalah memfokuskan berkas elektron dengan energi tinggi untuk menghasilkan berbagai sinyal pada permukaan spesimen padat. Sinyal tersebut muncul dari interaksi sampel elektron yang dapat memberikan informasi tentang sampel

termasuk morfologi eksternal (tekstur), komposisi kimia, struktur kristal, dan orientasi bahan penyusun sampel. Prinsip kerja SEM secara rinci dijelaskan sebagai berikut:

1. Sebuah pistol elektron memproduksi sinar elektron dan dipercepat dengan anoda;
2. Lensa magnetik memfokuskan elektron menuju ke sampel;
3. Sinar elektron yang terfokus memindai keseluruhan sampel dengan diarahkan oleh koil pemindai;
4. Ketika elektron mengenai sampel, maka sampel akan mengeluarkan elektron baru yang akan diterima oleh detektor dan dikirim ke monitor (CRT). Ada beberapa sinyal yang penting yang dihasilkan oleh SEM. Dari pantulan inelastis didapatkan sinyal elektron sekunder dan karakteristik sinar X, sedangkan dari pantulan elastis didapatkan sinyal *backscattered electron* (Wijayanto & Bayuseno, 2014)

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari s.d. Mei 2023 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam pengujian ini, yaitu: spatula, *beaker glass*, neraca analitik, gelas ukur, erlenmeyer, *hotplate magnetic stirrer*, pipet volumetri, *bulb*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, penjepit tabung, jarum ose bulat, *autoclave*, penangas air, kulkas, bunsen, *biological safety cabinet*, botol semprot, *object* dan *cover glass*, mikroskop, pipet tetes, *Petridish*, mikropipet, mikrotip, inkubator, *shaker incubator*, *centrifuge*, sonikator, oven, *vortex mixer*, dan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

Bahan yang digunakan dalam pengujian ini, yaitu: media Luria Bertani, media Luria Bertani Dapar Asetat, media T3, HCl, NaOH, aquades, metanol, asam asetat, alkohol 70%, spirtus, kapas, *tissue*, *methylen blue*, *crystal violet*, kertas saring Whatman no. 1, pewarna Gram, sarung tangan, dan masker.



### 3.3 Metode

Penelitian ini menggunakan objek penelitian berupa enam isolat bakteri *Bacillus* sp. yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Isolat tersebut sebelumnya telah diisolasi dari tanah Kebun Raya Liwa, Lampung yang kemudian diberi kode isolat Bt 2, Bt 3, Bt 4, Bt 5, Bt 6, dan Bt 7. Keenam isolat akan diseleksi sebagai *Bacillus thuringiensis* dengan melakukan pengamatan morfologi secara makroskopis dan mikroskopis, sifat Gram dengan pewarnaan Gram, serta deteksi keberadaan kristal protein melalui pewarnaan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dan *crystal violet*. Selain itu, dilakukan pula eksplorasi bentuk kristal protein menggunakan SEM yang kemudian hasilnya disandingkan dengan literatur terkait. Isolat dipastikan sebagai *Bacillus thuringiensis* jika menunjukkan ciri Gram positif, berbentuk batang, serta dapat menghasilkan kristal protein yang ditunjukkan dengan kemampuan menyerap pewarna CBB dan *crystal violet*.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif kualitatif. Menurut Dafit & Ramadan (2020), penelitian deskriptif kualitatif ditujukan untuk mendeskripsikan dan menggambarkan fenomena-fenomena yang ada, baik bersifat alamiah maupun rekayasa manusia, yang lebih memperhatikan mengenai karakteristik, kualitas, dan keterkaitan antar kegiatan. Selain itu, penelitian deskriptif tidak memberikan perlakuan, manipulasi atau perubahan pada variabel - variabel yang diteliti, melainkan menggambarkan suatu kondisi yang apa adanya. Satu-satunya perlakuan yang diberikan adalah penelitian itu sendiri dan dilakukan salah satunya melalui observasi.

### 3.4 Peremajaan Isolat *Bacillus* sp.

Media Luria Bertani (LB) digunakan sebagai media tumbuh. Pada media Luria Bertani, per liter mengandung 10 g tripton, 5 g *yeast extract*, 10 g NaCl dan 15 g agar (Hermanto *et al.*, 2013). Satu ose isolat diambil secara aseptis,

diinokulasikan ke media LB agar miring dengan metode gores dan diinkubasi pada suhu ruang  $\pm$  24 jam. Koloni yang tumbuh diamati hingga diperoleh koloni yang seragam. Validasi dilakukan dengan melihat bentuk sel menggunakan pewarnaan sederhana *methylene blue* yang diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000x. Jika bentuk sel sudah seragam, diasumsikan isolat bakteri tersebut telah murni (Mafazah & Zulaika, 2017).

### 3.5 Validasi Kemurnian Isolat *Bacillus thuringiensis*

Untuk lebih memastikan bahwa koloni yang diperoleh pada media Luria Bertani merupakan *Bacillus thuringiensis*, dilakukan prosedur menurut (Bahri *et al.*, 2021) dengan modifikasi. Perlakuan dimulai dengan mengambil satu ose koloni yang ada pada media lalu dimasukkan ke dalam larutan LB dapar asetat dengan pH 6.8. Media LB dapar asetat dengan pH 6.8 yang digunakan merupakan media dengan pH optimum sehingga larutan ini merupakan media selektif dari *Bacillus thuringiensis*.

Setelah koloni tunggal dipindahkan ke dalam media selektif, selanjutnya diinkubasi dengan cara digoyangkan pada kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu, terlihat hasil koloni berada di dasar erlenmeyer dan selanjutnya dipanaskan pada suhu 80<sup>0</sup>C selama 15 menit (Nair *et al.*, 2018). Setelah itu dilakukan homogenisasi menggunakan vortex *mixer*. Pemanasan dilakukan agar bakteri lain selain *Bacillus thuringiensis* tidak dapat hidup atau mati. Kemudian dilakukan pengenceran 10<sup>-1</sup> hingga 10<sup>-5</sup> agar mendapatkan hasil koloni yang baik dan tidak terlalu padat. Selanjutnya koloni ditumbuhkan pada media Luria Bertani Agar miring dengan pH 6.8. Validasi kemurnian kembali dilakukan dengan mengamati bentuk sel pada mikroskop perbesaran 1000x melalui pewarnaan Gram.

### 3.6 Deteksi dan Pewarnaan Morfologi Kristal Protein

#### 3.6.1 Pembuatan Larutan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)

*Coomassie* 0.1 gram dilarutkan ke dalam 30 ml metanol, kemudian ditambahkan 5 ml asam asetat dan 65 ml aquades. Setelah itu, larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam kemudian disaring menggunakan kertas Whatman no. 1 dan disimpan pada suhu 20°C.

#### 3.6.2 Pewarnaan Kristal Protein

Satu ose *Bacillus thuringiensis* diinokulasikan pada gelas objek yang steril kemudian difiksasi. Setelah itu dibubuhkan pewarna *coomassie brilliant blue* dan didiamkan selama tiga menit. Pewarna CBB dapat digantikan oleh *crystal violet* sebagai pewarna alternatif kristal protein. Setelah dilakukan pewarnaan, gelas objek dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 1000x (Siallagan *et al.*, 2020). Koloni yang dipastikan membentuk protein kristal dipanen dan dikoleksi sebagai isolat baru serta disimpan pada LB agar miring dan diberi kode isolat.

### 3.7 Penentuan Waktu Terbentuknya Kristal Protein

Sebanyak satu ose isolat diinokulasikan pada media sporulasi T3 (per liter mengandung 3 g tripton, 2 g triptosa, 1.5 g *yeast extract*, 0.005 g MnCl<sub>2</sub>, 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dan 7.1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Hassan *et al.*, 2021) dan diinkubasi pada *shaker incubator*. Setiap interval tiga jam sekali dilakukan pengamatan terbentuknya kristal protein dengan mengambil satu ose isolat yang telah disiapkan sebelumnya, kemudian diratakan di atas *object glass*. Setelah itu dilakukan pewarnaan menggunakan *coomassie brilliant blue* ataupun *crystal violet* selama tiga menit lalu dibilas dengan air mengalir. Setelah kering, diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x. Pengamatan dilakukan selama 48 jam untuk memastikan waktu terbentuknya kristal protein serta karakter pertumbuhan setiap isolat.

### 3.8 Pengambilan Gambar *Scanning Electron Microscope* (SEM)

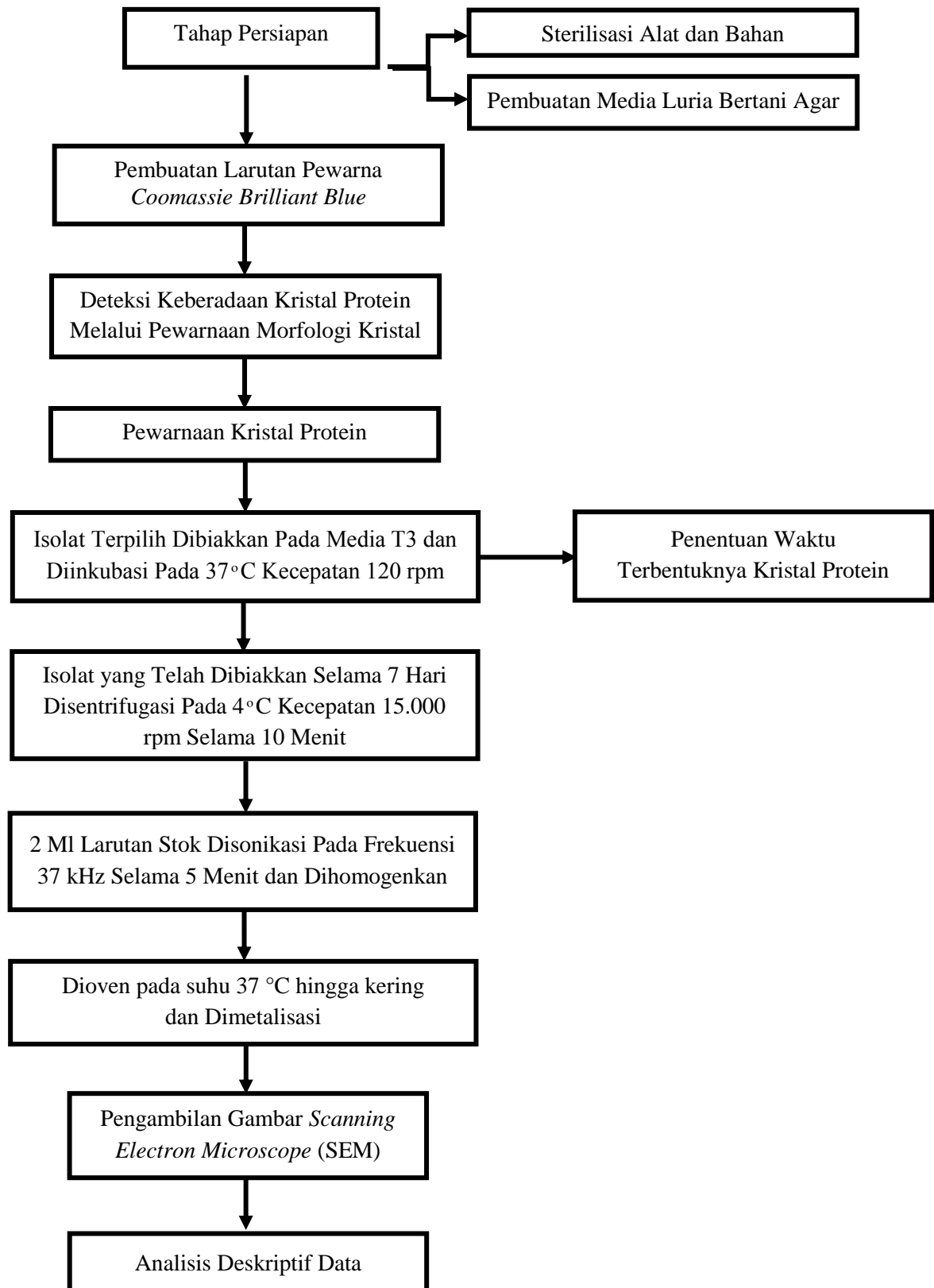
Prosedur pemindaian mikroskop elektron dijelaskan oleh (Loutfi *et al.*, 2021). *Scanning Electron Microscopy* ZEISS digunakan untuk menangkap gambar kristal dan spora. Dengan tegangan 15 KV, jarak antara sampel dan target ditetapkan 4 mm. Protokol preparasi sederhana dilakukan agar kristal dan spora selalu memiliki konsentrasi yang sama untuk galur yang berbeda saat mengambil gambar SEM.

Sel-sel isolat potensial *Bacillus thuringiensis* ditumbuhkan pada media T3. Selanjutnya diinkubasi dengan digoyangkan pada kecepatan 120 rpm suhu 37°C selama 7 hari untuk menginduksi sporulasi. Suspensi spora isolat *B. thuringiensis* kemudian disentrifugasi pada 15.000 rpm dan suhu 4°C selama 10 menit untuk dipanen campuran spora-kristal (Yilmaz *et al.*, 2017). Setelah itu 100 µL larutan stok (campuran kristal dan spora) ditambahkan ke 1900 µL aquades untuk mendapatkan total 2 mL. Tabung disonikasi selama 5 menit pada frekuensi 37 kHz untuk memecah agregasi dan kemudian tabung divorteks. Setelah itu, diambil 50 µL dari tabung dan diletakkan pada *sample holder* yang ditutup dengan mika yang telah dibelah. *Sample holder* kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 37 °C hingga kering. Setelah kering sampel dimetalisasi untuk membentuk deposit paladium emas 2.5 nm yang memungkinkan kristal dan spora menjadi konduktif. Akhirnya, sampel ditempatkan di ruang vakum SEM dan gambar diambil. Morfologi kristal dan spora dari masing-masing isolat dianalisis secara individual.

### 3.9 Analisis Deskriptif

Analisis deskriptif yang digunakan adalah dengan menggunakan analisis dalam bentuk gambar dan tabel yang bertujuan untuk memberikan gambaran secara umum mengenai morfologi kristal protein dari hasil gambar tiga dimensi *Scanning Electron Microscope* (SEM), serta waktu terbentuknya kristal protein.

### 3.10 Diagram Alir Penelitian



**Gambar 3.** Diagram alir penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Keenam isolat yang diamati merupakan *Bacillus thuringiensis* dengan sifat Gram positif, serta memiliki kemampuan untuk membentuk kristal protein.
2. Terdapat tujuh bentuk morfologi kristal protein dengan variasi yang berbeda dari keenam isolat *Bacillus thuringiensis*. Ketujuh bentuk tersebut adalah ovoid (oval), *spherical* (bulat), bipiramidal segitiga, *rectangle* (empat persegi panjang), *elongate* (memanjang), *cuboid* (kotak), serta *geometrical*. Ketujuh bentuk tersebut memiliki aktivitas yang spesifik terhadap ordo serangga tertentu, yaitu Isolat Bt 2 memiliki aktivitas toksin bagi Diptera, Coleoptera, dan Lepidoptera. Isolat Bt 3 berpotensi untuk menyerang Diptera. Kemudian Bt 4 toksin terhadap Diptera dan Coleoptera, Bt 5 terhadap Diptera dan Lepidoptera, Bt 6 terhadap Diptera dan Coleoptera, serta Bt 7 memiliki aktivitas toksin bagi ordo Diptera dan Lepidoptera.
3. Pengamatan waktu terbentuknya kristal protein pada keenam isolat menunjukkan hasil yang berbeda. Secara keseluruhan kristal protein sudah terlihat pada jam pertumbuhan ke-3 hingga ke-18. Hasil tersebut dapat dijadikan referensi pengujian aktivitas toksisitas isolat dalam hal waktu terbentuknya kristal dan jam pertumbuhan yang digunakan.

## 5.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan oleh peneliti untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Dilakukan pengujian toksisitas keenam isolat *Bacillus thuringiensis* terhadap ordo serangga tertentu sesuai dengan bentuk morfologi kristal protein yang telah diperoleh melalui SEM. Pengujian tersebut dapat disesuaikan dengan hasil waktu terbentuknya kristal protein.
2. Perlunya dilakukan analisis molekuler dengan gen 16S rRNA terhadap enam isolat untuk mengetahui subspecies ataupun serovar pada *Bacillus thuringiensis* yang digunakan, sehingga dapat dipastikan apakah terdapat kecocokan antara subspecies atau serovar *Bacillus thuringiensis* tersebut dengan bentuk kristal protein yang telah diperoleh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adalat, R., Saleem, F., Crickmore, N., Naz, S., & Shakoori, A. R. (2017). In Vivo Crystallization of Three-Domain Cry Toxins. *Toxins*, 9(3), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9030080>
- Adang, M. J., Crickmore, N., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In *Insect Midgut and Insecticidal Proteins* (1st Ed., Vol. 47). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>
- Addiniyah, N. R. (2019). *Tingkat Toksisitas Bacillus Thuringiensis Koleksi Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Vektor Dan Reservoir Penyakit ( B2p2vrp ) Salatiga Dan Isolat Surabaya Terhadap Berbagai Stadium Larva Aedes Aegypti*. Universitas Islam Negeri Sunan Ampel.
- Akhtar, M., Mizuta, K., Shimokawa, T., Maeda, M., Talukder, M. M. R., & Ikeno, S. (2021). Enhanced Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Using a Late Embryogenesis Abundant Peptide Co-Expression System. *Journal Of Microbiological Methods*, 188.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106207>
- Al-Thani, A., Ashfaq, M. Y., Al-Thani, R., Hassan, Z. U., & Jaoua, S. (2022). Bioresource Technology Reports Application of Scanning Electron Microscopy and Maldi-Tof Ms in The Exploration of the Parasporal Insecticidal Crystals of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated From Qatar Soil. *Bioresource Technology Reports*, 19(May), 101134.
- Astuti, D., Pujiastuti, Y., Shk, S., Damiri, N., Nugraha, S., Sembiring, E., & Mulawarman. (2018). Exploration of *Bacillus thuringiensis* Berl . From Soil and Screening Test its Toxicity on Insects of Lepidoptera Order. *Earth And Environmental Science*.
- Bahri, S., Zulkifli, L., Ayu, D., Rasmi, C., & Sedijani, P. (2021). Isolation,



Purification, and Toxicity Test of *Bacillus thuringiensis* From Cows Cage Soil Againsts *Drosophila melanogaster*. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(3), 1106–1114.

Banerjee, S., Montaville, P., Chavas, L. M. G., & Ramaswamy, S. (2018). The New Era of Microcrystallography Review. *Indian Inst. Sci.*, 30(10), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S41745-018-0086-0>

Dafit, F., & Ramadan, Z. H. (2020). Pelaksanaan Program Gerakan Literasi Sekolah (GLs) Di Sekolah Dasar. *Jurnal Basicedu*, 4(4), 1429–1437. <https://doi.org/10.31004/basicedu.V4i4.585>

Djenane, Z., Nateche, F., Amziane-Touazi, M., Gomis-Cebolla, J., Aichar, F. El, Khorf, H., & Ferre, J. (2017). Assessment of the Antimicrobial Activity and the Entomocidal Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates From Algeria. *Toxins*, 9(139). <https://doi.org/10.3390/Toxins9040139>

Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Sturman, E. J., Rydel, T. J., Zheng, M., Seale, J. W., & Franklin, S. (2014). Structure of The Full-Length Insecticidal Protein CryIac Reveals Intriguing Details of Toxin Packaging Into In Vivo Formed Crystals. *Protein Science*, 23(11), 1491–1497.

Fernández-Chapa, D., Ramírez-Villalobos, J., & Galán-Wong, L. (2019). *Toxic Potential Of Bacillus Thuringiensis : An Overview*.

Hamidah, M. N., Rianingsih, L., & Romadhon. (2019). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Peda Dengan Jenis Ikan Berbeda Terhadap *E. coli* Dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Perikanan*, 1(2), 11–21.

Hassan, A. A., Youssef, M. A., Elashtokhy, M. M. A., Ismail, I. M., Aldayel, M., & Afkar, E. (2021). Isolation and Identification of *Bacillus thuringiensis* Strains Native of the Eastern Province of Saudi Arabia. *Egyptian Journal Of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/S41938-020-00352-8>

Hermanto, S., Jusuf, E., & Shiddiqi, M. H. (2013). Eksplorasi Protein Toksin *Bacillus thuringiensis* Dari Tanah Di Kabupaten Tangerang. *Valensi*, 3(1), 48–56.

Jacups, S. P., Rapley, L. P., Johnson, P. H., Benjamin, S., & Ritchie, S. A. (2013). *Bacillus thuringiensis* Var. Israelensis Misting For Control of Aedes in Cryptic Ground Containers in North Queensland, Australia. *American*

*Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, 88(3), 490–496.

- 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.
- Janah, S. M., Handayani, K., Ekowati, C. N., & Sumardi. (2022). Uji Aktivitas Enzim Protease Kandidat *Bacillus thuringiensis* Asal Tanah Kebun Raya Liwa Kabupaten Lampung Barat. *Prosiding Seminar Nasional Biologi Iv*, 848–864.
- Khorramnejad, A., Dominguez, M., Caballero, P., Escriche, B., & Bel, Y. (2020). Study of the *Bacillus thuringiensis* CryIia Protein Oligomerization Promoted by Midgut Brush Border Membrane Vesicles of Lepidopteran and Coleopteran Insects, or Cultured Insect Cells. *Toxins*, 12(133), 1–15.
- Lantang, D., & Runtuboi, D. Y. P. (2018). Karakterisasi Bakteri *Bacillus thuringiensis* Asal Hutan Lindung Kampus Uncen Jayapura, Serta Deteksi Toksisitasnya Terhadap Larva Nyamuk Anopheles. *Jurnal Biologi Papua*, 4(1), 19–24. <https://doi.org/10.31957/Jbp.531>
- Liu, J., Liang, Y. Shan, Hu, T., Zeng, H., Gao, R., Wang, L., & Xiao, Y. Hua. (2021). Environmental Fate of Bt Proteins In Soil: Transport, Adsorption/Desorption and Degradation. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 226, 112805. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112805>
- Loutfi, H., Fayad, N., Pellen, F., Jeune, B. Le, Chakroun, M., Benfarhat, D., Lteif, R., Kallassy, M., Brun, G. Le, & Abboud, M. (2021). Applied Sciences Morphological Study of *Bacillus thuringiensis* Crystals and Spores. *Applied Sciences*, 11(155), 1–15.
- Ma, X., Hu, J., Ding, C., Portieles, R., Xu, H., Gao, J., Du, L., Gao, X., Yue, Q., Zhao, L., & Borrás-Hidalgo, O. (2023). New Native *Bacillus thuringiensis* Strains Induce High Insecticidal Action Against *Culex pipiens* Pallens Larvae and Adults. *Bmc Microbiology*, 23(100), 1–14.
- 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), 4–8.
- Masta, N. (2020). *Buku Materi Pembelajaran Scanning Electron Microscopy*. Prodi Pendidikan Fisika Universitas Kristen Indonesia.

- Mukhija, B., & Khanna, V. (2018). Isolation , Characterization and Crystal Morphology Study of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soils of Punjab. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(March), 189–193. <https://doi.org/10.22207/Jpam.12.1.24>
- 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). <https://doi.org/10.3389/Fmicb.2018.00708>
- Nilles, J., Weiss, J., & Theile, D. (2022). *Reports Crystal Violet Staining is a Reliable Alternative to Bicinchoninic Acid Assay-Based Normalization* (Vol. 73, Issue 3). <https://doi.org/10.2144/Btn-2022-0064>
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: an Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325. <https://doi.org/10.3390/Toxins6123296>
- Rahbani, J., Salameh, D., Louka, N., Brandam, C., Rahbani, J., Salameh, D., Louka, N., Brandam, C., & Lteif, R. (2018). The Effect of Aeration Conditions , Characterized by the Volumetric Mass Transfer Coefficient  $K_L a$  , on the Fermentation Kinetics of *Bacillus thuringiensis* Kurstaki to Cite This Version : Hal Id : Hal-01917336 Oatao Is An Open Access Repository That Collec. *Journal Of Biotechnology*, 100–106.
- Rini, M. S., Rahadian, R., Hadi, M., & Zulfiana, D. (2018). Uji Efikasi Beberapa Isolat Bakteri Entomopatogen Terhadap Kecoa ( Orthoptera ) *Periplaneta americana* ( L . ) dan *Blatella germanica* ( L . ) dalam Skala Laboratorium. *Jurnal Biologi Tropika*, 1(1), 1–7.
- Sattar, S., Biswas, P. K., Hossain, M. A., Maiti, M. K., & Sen, S. K. (2008). Search For Vegetative Insecticidal Proteins ( Vips ) From Localisolates of *Bacillus thuringiensis* Effective Against Lepidopteranand Homopteran Insect Pests. *Journal Of Biopesticides* , 1(2), 216–222.
- Sauka, D. H. (2017). *Bacillus thuringiensis*: New Applications for an Old Acquaintance? *Rev Argent Microbiol*, 49(2), 123–124. <https://doi.org/10.1016/J.Ram.2017.05.001>
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and

Stink Bugs In Soybean Culture . *Isrn Microbiology*, 2014, 1–12.  
<https://doi.org/10.1155/2014/135675>

Siallagan, M. D., Ekowati, C. N., & Rosa, E. (2020). Deteksi Kristal Protein Pada Isolat *Bacillus Sp* . *Biospecies*, 13(2), 46–49.

Wahyuni, & Wirawan, H. P. (2017). Buletin Diagnosa Veteriner. *Medik Veteriner, Balai Besar Veteriner Maros*, 16(2), 9–17.

Wang, J., Mei, H., Qian, H., Tang, Q., Liu, X., Yu, Z., & He, J. (2013). Expression Profile and Regulation of Spore and Parasporal Crystal Formation-Associated Genes in *Bacillus thuringiensis*. *Journal Of Proteome Research*, 12(12), 5487–5501. <https://doi.org/10.1021/pr4003728>

Wijayanto, S. O., & Bayuseno, A. P. (2014). Analisis Kegagalan Material Pipa Ferrule Nickel Alloy N06025 Pada Waste Heat Boiler Akibat Suhu Tinggi Berdasarkan Pengujian : Mikrografi Dan Kekerasan. *Teknik Mesin*, 2(1), 33–39.

Yilmaz, S., Cetin, A., & Temizgul, R. (2017). *Bacillus thuringiensis* Parasporins and Their Use in Controlling Cancer Cells. *European Journal Of Sustainable Development Research*, 2(1), 57–62.