

**EKSPLORASI PROTEIN TOKSIN ISOLAT *Bacillus thuringiensis* ASAL
KEBUN RAYA LIWA, KABUPATEN LAMPUNG BARAT**

(Skripsi)

Oleh

**MUHAMMAD RIAN HIDAYAT
NPM 1917021041**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**EKSPLORASI PROTEIN TOKSIN ISOLAT *Bacillus thuringiensis* ASAL
KEBUN RAYA LIWA, KABUPATEN LAMPUNG BARAT**

Oleh

MUHAMMAD RIAN HIDAYAT

(Skripsi)

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

EKSPLORASI PROTEIN TOKSIN ISOLAT *B. thuringiensis* ASAL KEBUN RAYA LIWA, KABUPATEN LAMPUNG BARAT

Oleh

MUHAMMAD RIAN HIDAYAT

Bacillus thuringiensis diketahui memiliki kemampuan memproduksi toksin bagi hama serangga. Toksin yang dihasilkan telah banyak digunakan sebagai agensia bahan baku pestisida yang baik dalam pertanian dan aman terhadap kesehatan serta ramah lingkungan. Toksin tersebut diproduksi pada saat *B. thuringiensis* bersporulasi. *B. thuringiensis* merupakan mikroba yang tergolong kosmopolitan yang tersebar luas di alam. Habitat umum *B. thuringiensis* adalah tanah. Ekosistem tanah di Kebun Raya Liwa sebagai salah satu kawasan konservasi di Provinsi Lampung memiliki banyak potensi kehidupan bagi *B. thuringiensis* yang sangat strategis untuk dieksplorasi lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki tujuan mengeksplorasi protein toksin yang berasal dari isolat *B. thuringiensis* asal Kebun Raya Liwa berdasarkan bobot molekulnya. Protein dikuantifikasi menggunakan metode *lowry* dan *profiling* protein menggunakan bantuan elektroforesis SDS PAGE. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa dari kelima isolat *B. thuringiensis* Bt 7 merupakan isolat dengan konsentrasi protein tertinggi yakni 1.325 mg/ml dan terendah yakni Bt 2 yaitu 0.730 mg/ml. Lima isolat *B. thuringiensis* memiliki bobot molekul yang relatif identik. Isolat *B. thuringiensis* Bt 2, Bt 3, Bt 6 dan Bt 7 memiliki bobot molekul 110.59 kDa, sedangkan Bt 5 bobot molekulnya yakni 76.97 kDa.

Kata kunci: Protein toksin, *Bacillus thuringiensis*, Kebun Raya Liwa, SDS PAGE

ABSTRACT

EXPLORATION OF TOXIN PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATES FROM LIWA BOTANICAL GARDEN, WEST LAMPUNG DISTRICT

By

MUHAMMAD RIAN HIDAYAT

Bacillus thuringiensis is known to have the ability to produce toxin for insect pests. The toxin produced has been widely used as a good pesticide raw material agent in agriculture and is safe for health and environmentally friendly. The toxin is produced when *B. thuringiensis* speculates. *B. thuringiensis* is a cosmopolitan microbe that is widely distributed in nature. The general habitat of *B. thuringiensis* is soil. The soil ecosystem in Liwa Botanical Garden as one of the conservation areas in Lampung Province has a lot of potential life for *B. thuringiensis* which is very strategic to be explored further. Therefore, this study aims to explore toxin proteins derived from *B. thuringiensis* isolates from Liwa Botanical Garden based on their molecular weights. Proteins were quantified using the Lowry method and protein profiling using SDS PAGE electrophoresis. The results showed that of the five *B. thuringiensis* isolates, Bt 7 was the isolate with the highest protein concentration of 1.325 mg/ml and the lowest was Bt 2, which was 0.730 mg/ml. Five isolates of *B. thuringiensis* have relatively identical molecular weights. *B. thuringiensis* isolates Bt 2, Bt 3, Bt 6 and Bt 7 have a molecular weight of 110.59 kDa, while Bt 5 molecular weight is 76.97 kDa.

Keywords: Toxin protein, *Bacillus thuringiensis*, Liwa Botanical Garden, SDS PAGE.

Judul Skripsi : **EKSPLORASI PROTEIN TOKSIN ISOLAT
Bacillus thuringiensis ASAL KEBUN RAYA LIWA,
KABUPATEN LAMPUNG BARAT**

Nama Mahasiswa : **Muhammad Rian Hidayat**

Nomor Pokok Mahasiswa: 1917021041

Jurusan/Program Studi : **Biologi/S1 Biologi**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

A blue ink signature of Dr. Kusuma Handayani.

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

A black ink signature of Wawan A Setiawan.

Wawan A Setiawan, S. Si., M. Si
NIP 197912302008121001


Katua Jurusan


A black ink signature of Dr. Jani Master.

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

Anggota Penguji : Wawan A Setiawan, S.Si., M.Si. 

Penguji Utama : Rochmah Agustrina, Ph.D. 



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 28 Juli 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhammad Rian Hidayat
NPM : 1917021041
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya yang berjudul :

**“EKSPLORASI PROTEIN TOKSIN ISOLAT *Bacillus thuringiensis* ASAL
KEBUN RAYA LIWA, KABUPATEN LAMPUNG BARAT”**

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,



Muhammad Rian Hidayat

NPM.1917021041

RIWAYAT HIDUP



Penulis memiliki nama lengkap Muhammad Rian Hidayat, dilahirkan di Prabumulih, Sumatera Selatan pada tanggal 7 September 2001. Penulis merupakan anak bungsu dari pasangan Bapak Irawansyah dan Ibu Sri Mardalena, Am. Keb., SKM dengan dua kakak kandung yakni dr. Welly Alam Prakasa dan dr. Irna Anggraini. Penulis mulai menempuh pendidikan di Taman Kanak-Kanak (TK) Al-Muhajirin, Muara Enim pada tahun 2006-2007,

dilanjutkan ke jenjang Sekolah Dasar di SD Negeri 13 Gunung Megang pada tahun 2007-2013. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan menengah di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Lematang Lestari, Muara Enim pada tahun 2013-2016 dan menempuh jenjang yang lebih tinggi di Sekolah Menengah Atas (SMA) Plus Negeri 17 Palembang pada tahun 2016-2019. Setelah lulus sebagai lulusan terbaik 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 beberapa organisasi kemahasiswaan dan menjadi ketua bidang Sains dan Teknologi HIMBIO periode 2021. Pada tahun yang sama, penulis tergabung pula sebagai anggota dari *Incoming Global Volunteer* AIESEC Universitas Lampung serta anggota dari *Human Recourse Development English Society* Universitas Lampung. Lalu tahun berikutnya, penulis tergabung dalam UKM PIK R Raya Universitas Lampung yang mengantarkan penulis sebagai Kepala Sub Bidang *Life Skill* sekaligus Duta Generasi Berencana (GenRe) Universitas Lampung 2021. Perjuangan penulis dalam program GenRe berlanjut hingga tahap Provinsi sebagai

Juara 2 Putra Duta GenRe Provinsi Lampung sekaligus hingga 2024 menjadi sekretaris umum II di Forum GenRe Lampung dan mewakili Provinsi Lampung di ajang Nasional dan berhasil membawa pulang gelar Sebagai Juara 2 Putra Duta GenRe Indonesia 2022. Selain itu, Penulis juga berperan aktif sebagai asisten Laboratorium Mikrobiologi selama dua tahun perkuliahan dengan praktikum yang diampu meliputi Fisiologi Mikroba dan Mikrobiologi Pangan dan Industri 2021-2022. 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 Sampel Air Limbah Domestik dengan Parameter Total Coliform Menggunakan Metode *Most Probable Number* (MPN) Di Laboratorium Mikrobiologi Bspji Bandar Lampung” Pada tahun yang sama, penulis melaksanakan salah satu Tri Dharma Perguruan Tinggi, yakni Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Negara Saka, Kecamatan, Jabung, Kabupaten Lampung Timur pada Bulan Juni – Agustus.

Selain aktif secara akademik dan berorganisasi, penulis memiliki berbagai pengalaman dan capaian seperti menjadi narasumber, juri mengikuti kompetisi, dan memperoleh beasiswa. Kompetisi yang pernah diraih penulis selain Duta Generasi Berencana adalah *Gold Medal di World Young Invention and Innovation Award*, Juara 1 Lomba Karya Tulis Ilmiah di Universitas Negeri Medan *Fest*, Juara 2 dan Presentasi terbaik pada *Business Plan Competition* serta beberapa juara di lomba kepenulisan lainnya menjadikan penulis sebagai Mahasiswa Berprestasi III Universitas Lampung 2021. Selain itu, penulis pula aktif mengikuti Program Kampus Merdeka di Magang Merdeka di Perusahaan PT. Nutrifood Indonesia sebagai *area marketing and business development* selama satu tahun dengan *grand project* yang dibahas mengenai Program *Seasonal* dan Tinanisasi pada produk Lokalate serta *World Diabetes Day 2023* bersama Tropicana Slim

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 Irawansyah dan Ibu Sri Mardalena, Am. Keb., SKM. 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.);

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

Almamater tercinta, Universitas Lampung.

MOTTO

"Cukuplah Allah menjadi Penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik Pelindung." (Q.S Ali Imran: 173)

"Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi orang lain." (Hadits Riwayat ath-Thabrani)

"Sesungguhnya pertolongan akan datang bersama kesabaran." (HR. Ahmad)

"Setiap orang punya jatah gagal. Habiskan jatah gagalmu saat muda"
(Dahlan Iskan)

The deeper the depth, the higher the pressure, and it turns carbon to form diamond crystal. It is analogous with us, human beings. The more pressure we have, will turns us to be stronger, harder, and more precious person, as diamond is

"The Harder Pressure, The Brighter The Diamond"

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 “**Eksplorasi Protein Toksin Isolat *Bacillus thuringiensis* Asal Kebun Raya Liwa, Kabupaten Lampung Barat**” 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 Irawansyah dan Ibu Sri Mardalena, Am. Keb., SKM yang selalu memberikan motivasi, kasih sayang, doa dan perjuangan luar biasa serta menjadi alasan bagi penulis untuk tidak pernah lelah berjuang;
2. Kak dr. Welly Alam Prakasa dan Ayuk dr. Inna Anggraini 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 Prof. Sumardi. Tugiyono, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik penulis 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. Bapak Wawan Abdullah Setiawan, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing II yang senantiasa memberikan masukan dan wawasan mengenai metode yang akan digunakan selama penelitian serta ilmu kehidupan karir yang dibagikan
9. Mending Ibu Dra. Christina Nugroho Ekowati selaku dosen penguji 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;
10. Ibu Rochmah Agustrina, Ph.D. selaku dosen penguji pengganti yang telah memberikan arahan, saran, dan masukan yang membangun dengan penuh kesabaran kepada penulis;
11. Seluruh Bapak/Ibu dosen Jurusan Biologi atas ilmu yang telah diberikan selama mengikuti perkuliahan;
12. Bapak Prof. Dr. Sumardi 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 l seluruh peneliti mikrobiologi selama bertugas, saran dan masukan, doa-motivasi, hal positif, dan semangat yang selalu diberikan untuk penulis;
14. Sahabat seperjuangan selama proses perkuliahan, Pejuang *Cumlaude*:Rachmat Nugraha Indra, 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 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,

Muhammad Rian Hidayat

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
ABSTRAK	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	v
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Kerangka Pemikiran	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.1.1 Morfologi dan Fisiologi	4
2.1.2 Klasifikasi	5
2.1.3 Ekologi.....	6
2.2 Protein.....	6
2.2.1 Struktur Protein.....	7
2.2.2 Analisis Kadar Protein	9
2.2.3 Protein Toksin <i>B. thuringiensis</i>	9
2.2.4 Biosintesis Protein Toksin <i>B. thuringiensis</i>	11
2.3 Karakterisasi Bobot Molekul Protein Melalui <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> <i>Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS PAGE)</i>	12

2.4 Kebun Raya Liwa	13
III.METODE	4
3.1 Tempat dan Waktu	4
3.2 Alat dan Bahan	4
3.3 Metode.....	15
3.3.1 Preparasi Isolat.....	15
3.3.2 Isolasi Protein Toksin	16
3.3.3 Kuantifikasi Kadar Protein	16
3.3.4 Pembuatan Kurva Standar	17
3.3.5 Analisis Bobot Molekul Protein dengan <i>SDS-PAGE</i>	17
3.4 Diagram Alir Penelitian.....	18
IV.HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Hasil.....	19
4.1.1 Isolat <i>B. thuringiensis</i> Kebun Raya Liwa Kabupaten Lampung Barat.....	19
4.1.2 Isolasi Protein Toksin	20
4.1.3 Profil Protein Hasil Analisis <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS PAGE)</i>	21
4.2 Pembahasan	23
V. SIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Simpulan.....	29
5.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mikrograf elektron <i>B. thuringiensis</i> INTATA24-6	4
Gambar 2. Skematis adaptasi nomenklatur protein ke berbagai struktur	8
Gambar 3. Sporulasi pada <i>B. thuringiensis</i> sesuai tahapan standar sporulasi	11
Gambar 4. Isolasi Bakteri Berkristal di Media T3	20
Gambar 5. Pellet Hasil Isolasi Protein Toksin Isolat Bakteri	20
Gambar 6. Hasil Analisis SDS PAGE Bt 2, Bt 3, Bt 5 dan Bt 7	22
Gambar 7. Hasil Analisis SDS PAGE Bt 6	23
Gambar 8. Fase dan Mekanisme Kerja <i>B. thuringiensis</i>	28
Gambar 9. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik Bt 2	35
Gambar 10. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik Bt 3	35
Gambar 11. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik Bt 5	35
Gambar 12. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik Bt 6	36
Gambar 13. Hasil Pengamatan Morfologi secara Mikroskopik Bt 7	36
Gambar 14. Kurva Standar Protein Terlarut Sampel	36
Gambar 15. Kurva Standar Marker SLAB 2	37
Gambar 16. Kurva Standar Marker SLAB 1	37
Gambar 17. Kurva Standar Marker Ulangan	37
Gambar 18. SDS PAGE Gel Poliakrilamid SLAB 1	38
Gambar 19. SDS PAGE Gel Poliakrilamid SLAB 2	38
Gambar 20. SDS PAGE Gel Poliakrilamid Ulangan	38

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Asal Tanah Sampel	19
Tabel 2. Nilai Absorbansi dan Konsentrasi Sampel	21
Tabel 3. Nilai Bobot Molekul Sampel dari Analisis SDS PAGE	21

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Bacillus thuringiensis merupakan jenis bakteri gram positif yang telah banyak digunakan dalam bidang bioteknologi pertanian karena bersifat toksin bagi beberapa hama serangga tanaman seperti pada ordo Diptera dan Lepidoptera (I-Thani *et al.*, 2022). *B. thuringiensis* telah diidentifikasi sebanyak 70 subspecies dan menghasilkan lebih dari 300 toksin *Cry* dari 1000 galur dan hanya beberapa galur yang telah dimanfaatkan (Melo *et al.*, 2016).

Kemampuan *B. thuringiensis* menghasilkan toksin *cry* menjadikan bakteri ini dikenal sebagai bagian dari bakteri entomopatogen. Toksisitas bakteri ini didukung oleh kristal protein yang dibentuk saat sel bersporulasi (Ohba *et al.*, 2009).

Selama sporulasi, *B. thuringiensis* membentuk kristal parasporal yang terdiri atas protein kristal insektisida (*ICPs*) yang biasanya mewakili hingga 25% massa kering sel dari sel yang bersporulasi. ICP telah digunakan sebagai pestisida hayati (bioinsektisida) untuk menanggulangi serangga yang menjadi hama tanaman pertanian. Disamping itu, *B. thuringiensis* memiliki bentuk yang beranekaragam dan bentuk tersebut berkorelasi dengan kemampuan toksisitasnya. Jenis bentuk dari kristal protein ini dipengaruhi oleh bobot molekul protoksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* (Jusuf, 2009).

Selain kristal proteinnya yang memiliki ciri khas, habitat *B. thuringiensis* juga menjadi faktor pembeda protein toksin dengan *B. thuringiensis* lainnya. *B. thuringiensis* berasal dari banyak lingkungan termasuk tanah, bangkai serangga, kontaminan di permukaan produk kemasan, daun tanaman dan lingkungan perairan. Kondisi tanah dengan kelembaban yang tinggi akan menjadi habitat yang baik bagi *B. thuringiensis* (Maeda *et al.*, 2000). Keadaan

ekosistem tanah Kebun Raya Liwa dengan curah hujan rata-rata tahunan 2500-3000 mm dengan kelembaban relatif 50-80% (Wilyasari *et al.*, 2020) sangat strategis, untuk dieksplorasi mengenai keberagaman yang belum teridentifikasi, salah satunya ialah protein toksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis*.

Berdasarkan permasalahan yang telah disajikan, penelitian ini difokuskan untuk mengeksplorasi sumber daya hayati Indonesia, khususnya bakteri dari galur *Bacillus* yang telah diisolasi dari Kebun Raya Liwa oleh Janah *et al.*, 2022. Isolat *B. thuringiensis* tersebut belum dieksplorasi lebih jauh mengenai protein toksinnya sehingga perlu dilakukan analisis dengan SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*).

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengkarakterisasi protein toksin isolat *B. thuringiensis* isolat Bt 2, Bt 3, Bt 5, Bt 6 dan Bt 7 asal Kebun Raya Liwa yang didapat berdasarkan karakteristik protein dan bobot molekulnya melalui analisis SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*).

1.3 Kerangka Pemikiran

B. thuringiensis adalah bakteri entomopatogen yang telag menghasilkan lebih dari 300 protein *Cry* sebagai protein toksin dari 1000 galur. Protein *Cry* yang membentuk kristal dan toksik terhadap serangga merupakan bagian dari kelompok δ -endotoksin. Proses pembentukan kristal protein adalah saat fase sporulasi. Beberapa bentuk kristal protein yang dihasilkan dapat berbentuk bulat, oval, elips atau silinder. Perbedaan bentuk kristal bergantung pada komposisi dan oleh bobot molekul protoksin yang dihasilkan *B. thuringiensis*.

Keanekaragaman protein toksin *B. thuringiensis* dapat dieksplorasi dari berbagai ekosistem tanah. Kebun Raya Liwa memiliki kondisi tanah dengan kelembaban yang tinggi dan merupakan habitat yang baik bagi *B. thuringiensis*. Selain itu, Kebun Raya Liwa pula memiliki keanekaragaman jenis tanah seperti tanah serasah, tanah biopori, tanah *Araceae* dan lainnya. Keadaan tersebut menjadikan protein toksin yang dihasilkan oleh *B. thuringiensis* akan beragam pula dan sangat strategis untuk dieksplorasi lebih lanjut.

Pembentukan protein toksin ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, oksigen dan suhu lingkungan. Pada pH lingkungan yang cenderung konstan, sporulasi tidak akan terpengaruh secara signifikan, namun jika terjadi penurunan atau kenaikan pH secara signifikan maka hal tersebut akan mempengaruhi efisiensi sporulasi. Hal inilah juga mempengaruhi keragaman dari protein toksin yang dihasilkan.

Eksplorasi suatu protein dapat dilakukan dengan metode SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis*). SDS PAGE adalah teknik untuk memisahkan polipeptida berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik, yang merupakan fungsi dari panjang polipeptida atau bobot molekulnya. Aplikasi metode ini telah banyak digunakan untuk mengestimasi bobot molekul senyawa dari beragam sumber seperti pangan atau mikroba. Metode ini umumnya digunakan untuk kepentingan biokimia, forensik, dan molekuler.

Penelitian sebelumnya telah diisolasi *B. thuringiensis* yaitu isolat Bt 2, Bt 3, Bt 5, Bt 6, dan Bt 7 dari Kebun Raya Liwa. Namun, isolat tersebut belum diketahui karakteristik protein toksinnya. Dengan demikian, penelitian ini mengkaji karakteristik toksin dari kelima isolat *B. thuringiensis* menggunakan SDS PAGE.

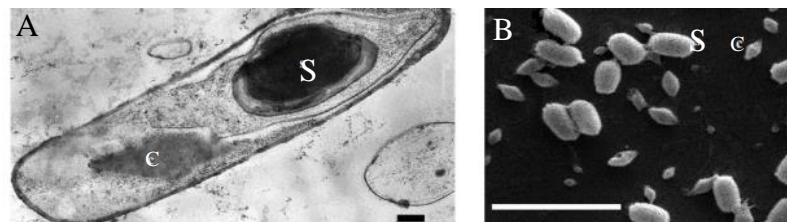
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Morfologi dan Fisiologi

B. thuringiensis merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang, panjang 3-5 μm dan lebar 1-1,2 μm , memiliki flagela, bersifat aerob, ciri khas yang membedakan dengan spesies *Bacillus* lainnya adalah kemampuannya membentuk kristal paraspora yang berdekatan dengan endospora selama fase sporulasi ke III dan IV. Bakteri ini termasuk patogen fakultatif dan memiliki habitat alami yang beragam (Patel *et al.*, 2012).

B. thuringiensis termasuk bakteri mesofil dengan kisaran suhu pertumbuhan 15-45 °C suhu optimumnya antara 26-37 °C, dan kisaran pH pertumbuhan antara 5,5 sampai 8,5 dengan pH optimum antara 6,5 sampai 7,5. Spora berbentuk oval berwarna hijau kebiruan, berukuran 1,0-1,3 μm dengan posisi terminal, sedangkan protein kristal berukuran 0,6 sampai 2,0 μm seperti dapat dilihat pada **Gambar 1** bergantung dari tipenya (Sauka *et al.*, 2010).



Gambar 1. Mikrograf elektron *B. thuringiensis* INTATA24-6 (A). Mikrograf elektron transmisi dari sel sporulasi menunjukkan spora; (B). Hasil mikrograf elektron spora (S); dan (C). Kristal Protein Toksin.

B. thuringiensis memiliki kristal toksin yang spesifik terhadap invertebrata khususnya dari nematoda dan insekta pada fase larva. Beberapa insekta yang rentan terhadap toksin *B. thuringiensis* yaitu lepidoptera, diptera dan coleoptera. Toksin *B. thuringiensis* efektif membunuh insekta pada saat fase larva. Larva insekta umumnya memiliki perbedaan morfologi, fisiologi dan perilaku dengan insekta fase dewasa. Fase larva memiliki fisiologi dan morfologi yang lebih sederhana sehingga sangat sensitif terhadap dampak toksin *B. thuringiensis* (Sansinenea, 2016).

Secara alami *B. thuringiensis* adalah bakteri entomopatogen dan sampai saat ini telah teridentifikasi sebanyak 70 subspecies atau varietas. Selain itu, variasi terdapat pula pada protein cry (Mafazah & Zulaika, 2017).

Perbedaan antar varietas ditentukan oleh serologi dari antigen *flagella*. Diketahui terdapat lebih dari 300 protein *Cry* dari 1000 bakteri dan hanya beberapa galur yang telah dimanfaatkan. Protein *Cry* merupakan bentuk protoksin yang disintesis oleh *B. thuringiensis* pada saat pembentukan spora yang berada di dalam sel sampai sel mengalami lisis sesudah sporulasi sempurna. Spora bagi bakteri merupakan suatu sistem perlindungan diri dari lingkungan luar yang buruk, karena dinding spora terusun atas protein keratin yang bersifat *impermeable* (Melo *et al.*, 2016).

2.1.2 Klasifikasi

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Bacillales
Family	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Species	: <i>Bacillu thuringiensis</i> (Norris, 1964).

2.1.3 Ekologi

B. thuringiensis secara alami dapat ditemui di ekosistem yang luas. Habitat alami *B. thuringiensis* umumnya ekosistem tanah seperti pada tanah serasah, tanah biopori, tanah *Araceae* dan lainnya. Selain itu, *B. thuringiensis* berasal dari banyak lingkungan lain termasuk serangga yang sudah mati, kontaminan di permukaan produk kemasan, daun tanaman dan lingkungan perairan (Ichimatsu *et al.*, 2000). *B. thuringiensis* diketahui berhasil juga diisolasi dari sedimen laut (Maeda *et al.*, 2000) dan juga dari tanah di Antartika (Forsty dan Logan, 2000). Dengan demikian, jelas bahwa *B. thuringiensis* tersebar luas di alam. Namun, habitat normal organisme tersebut adalah tanah. *B. thuringiensis* tumbuh secara alami sebagai saprofit, memakan bahan organik mati, oleh karena itu spora *B. thuringiensis* bertahan di dalam tanah dan pertumbuhan vegetatif terjadi ketika nutrisi tersedia. Oleh karena itu, *B. thuringiensis* juga dapat ditemukan pada serangga mati (Maeda *et al.*, 2000).

Meskipun penyebarannya kristal parasporal yang bersifat toksin bagi banyak ordo serangga, namun terdapat strain *B. thuringiensis* yang diperoleh dari berbagai lingkungan tidak menunjukkan aktivitas insektisida. Maeda *et al.* (2000) menemukan bahwa ada jenis *B. thuringiensis* yang diperoleh dari lingkungan laut Jepang tidak menunjukkan aktivitas yang membahayakan bagi hama serangga tanaman.

2.2 Protein

Protein merupakan makromolekul polimer asam amino yang tersusun dari atom nitrogen, karbon, dan oksigen satu sama lain terikat melalui ikatan peptida. Beberapa jenis asam amino yang mengandung sulfur. Protein berperan sebagai pembentuk struktur sel dan beberapa jenis protein memiliki peran fisiologis (Abdulgani, 2013).

Protein berasal dari kata *proteos* (kepala atau pertama), suatu senyawa makromolekul yang memegang peranan penting dalam setiap makhluk hidup. Protein adalah polipeptida yang berat molekulnya sangat bervariasi, dari 5×10^3 hingga 1×10^6 Dalton. Selain berat molekul yang berbeda, protein juga memiliki sifat yang berbeda yang fungsi spesifiknya ditentukan oleh urutan gen yang mengkodonya (Syahputra *et al.*, 2014).

2.2.1 Struktur Protein

a. Struktur primer

Struktur ini terdiri atas satu rantai protein yang asam amino penyusunnya tidak membentuk ikatan selain ikatan peptida. Struktur primer menunjukkan jumlah, jenis, dan urutan asam amino dalam molekul protein. Struktur primer protein juga menunjukkan ikatan peptida yang urutannya diketahui (Syahputra *et al.*, 2014).

b. Struktur sekunder

Struktur sekunder dibentuk karena adanya ikatan hidrogen antara hidrogen amida dan oksigen karbonil dari rangka peptida. Struktur sekunder utama meliputi *a-heliks* dan *β -sheets*. Bentuk paralel terjadi apabila rantai polipeptida yang berikatan melalui ikatan hidrogen itu sejajar dan searah, sedangkan bentuk anti paralel terjadi apabila rantai polipeptida berikatan dalam posisi sejajar tapi berlawanan arah (Petrey dan Honig, 2009)

c. Struktur tersier

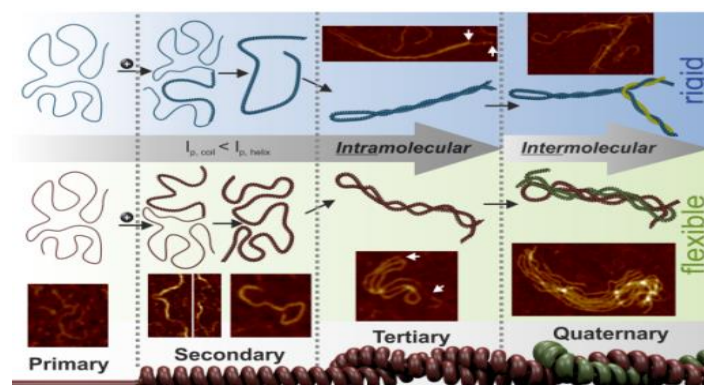
Struktur tersier menggambarkan rantai polipeptida yang mengalami pelipatan sempurna yang kompak. Beberapa polipeptida yang terdiri atas beberapa protein globular yang berbeda dihubungkan oleh residu asam

amino. Struktur tersier menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk lipatan atau gulungan, sehingga membentuk struktur yang lebih kompleks. Struktur ini dimantapkan oleh adanya beberapa ikatan antara gugus alkil pada molekul asam amino yang membentuk protein. Beberapa jenis ikatan alkil misalnya (a) ikatan elektrostatik, (b) ikatan hidrogen, (c) interaksi hidrofob antara rantai samping non polar, (d) interaksi dipol-dipol, dan (e) ikatan disulfida (Cheng *et al.*, 2005).

d. Struktur kuartener

Struktur ini melibatkan asosiasi dua atau lebih rantai polipeptida yang membentuk multi sub unit atau protein oligomerik. Rantai polipeptida yang membentuk multi sub unit atau protein oligomerik. Rantai polipeptida penyusun protein oligomerik dapat sama atau berbeda. Struktur kuartener menunjukkan adanya interaksi intermolekul antar unit-unit protein. Sebagian besar protein globular terdiri atas beberapa rantai polipeptida yang terpisah. Rantai polipeptida ini saling berinteraksi membentuk persekutuan (Syahputra *et al.*, 2014).

Sesuai pernyataan (Syahputra *et al.*, 2014), protein dapat dikelompokkan menjadi empat tingkat struktur yang ditunjukkan oleh **Gambar 2** di bawah ini.



Gambar 2. Skematis adaptasi nomenklatur protein dari struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener (Diener *et al.*, 2019).

2.2.2 Analisis Kadar Protein

Identifikasi protein dapat dilakukan secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisa kualitatif dapat dilakukan untuk mengetahui keberadaan atau jenis protein dalam suatu bahan. Sedangkan uji kuantitatif dapat dilakukan untuk mengetahui jumlah kandungan protein dalam suatu bahan. Identifikasi secara kualitatif, yaitu melalui reaksi xantoprotein, *Hopkins-Cole*, reaksi *Millon*, reaksi natrium nitroprusida dan reaksi *Sakaguchi*. Sedangkan secara kuantitatif, yaitu metode *Kjeldahl*, metode titrasi *formol*, metode *Lowry*, metode biuret, dan metode spektrofotometer UV. Pada penelitian ini metode yang digunakan dalam mengidentifikasi protein adalah metode *Lowry*. Hal ini dilakukan karena protein toksin sebagai jenis *Cry* memiliki perbedaan kadar protein jenisnya disebabkan oleh perbedaan biomassa isolatnya. Biomassa isolat dipengaruhi oleh proses sporulasinya (Shiddiqi *et al.*, 2013).

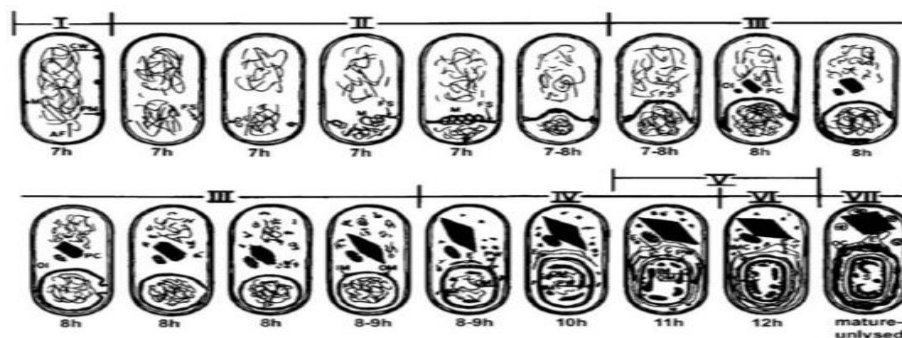
Metode *Lowry* merupakan kombinasi antara pereaksi biuret dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* yang bereaksi dengan residu tirosin dan triptofan dalam protein. Reaksi yang terjadi menghasilkan warna kebiruan yang bisa dibaca melalui spektrofotometri pada panjang gelombang antara 500 - 750 nm, tergantung sensitivitas yang dibutuhkan. Hasil yang muncul berupa puncak kecil di sekitar 500 nm yang dapat digunakan untuk menentukan protein dengan konsentrasi tinggi dan sebuah puncak besar di sekitar 750 nm yang dapat digunakan untuk menentukan kadar protein dengan konsentrasi rendah. Metode ini lebih sensitif untuk menganalisis protein konsentrasi rendah dibanding metode biuret (Abdulgani, 2013).

2.2.3 Protein Toksin *B. thuringiensis*

Protein toksin *B. thuringiensis* telah dikelompokkan menjadi tujuh kelas utama. Informasi tentang mekanisme cara kerja endotoksin ini penting

untuk menentukan proses kunci yang sangat dipengaruhi oleh kespesifikan dari struktur kristal protein. Parasporal kristal Bt akan memasuki tubuh serangga uji melalui saluran pencernaan. Kristal protein dapat diaktifkan menjadi δ -endotoksin atau protoksin dalam lingkungan basa saluran pencernaan. Protoksin dapat menjadi toksik jika teraktivasi oleh enzim protease serangga dan terikat pada reseptor tertentu di saluran pencernaan. Toksin *Cry* yang menempel pada peritropik membran memiliki kemampuan untuk melukai dan menyebabkan kebocoran sitoplasma, yang pada gilirannya menyebabkan kematian. Variasi dalam spektrum aktivitas strain ditunjukkan oleh perbedaan komponen *Cry* kristal (Schünemann *et al.*, 2014).

Kristal paraspora yang disintesis *B. thuringiensis* terdiri dari protein kristal insektisida (ICPs) yang biasanya mencapai hingga 25% massa kering sel-sel bakteri yang bersporulasi. Sporulasi pada *B. thuringiensis* berlangsung melalui tujuh tahap yang ditunjukkan pada **Gambar 3**. Tahap 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)



Gambar 3. Sporulasi pada *B. thuringiensis* sesuai tahapan standar sporulasi pada spesies Bacillus dan menunjukkan waktu relatif kemunculan badan parasporal (Federici *et al.*, 2006).

2.2.4 Biosintesis Protein Toksin *B. thuringiensis*

B. thuringiensis mampu mensintesis protein kristal yang kompleks selama proses sporulasi. Sebagian besar protein *Cry* penentu genetik terpenting yang bertanggung jawab atas sintesis tingkat tinggi ini adalah biomassa promotor yang dipengaruhi oleh sporulasi yang mengontrol transkripsi. Namun, ada beberapa faktor lain yang berperan penting dalam menentukan ukuran protein toksin antara lain, yakni protein aksesori atau *helper* spesifik yang biasanya menyertai gen *Cry* tertentu sebagai bagian dari operon dengan berat masa 65–80 kDa serta faktor kestabilan protein selama sintesis. Dalam kasus sederhana, seperti sintesis *Cry1Ac* pada isolat HD73 *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, terdapat dua promotor yang mengontrol sintesis protein yang sangat stabil (Federici *et al.*, 2006).

Proses pembentukan protein toksin, parasporal mengandung empat protein utama yang sintesisnya dan ukuran masing-masing inklusi ditentukan oleh satu atau lebih promotor, stabilitas transkrip, stabilitas setiap protein, dan protein aksesori pasca-translasi. Selama sporulasi, sel berkembang menjadi dua kompartemen utama, *forespore* dan sel induk. Promotor yang mengarahkan sintesis endotoksin beroperasi di sel induk, tempat protein *Cry* dan *Cyt* disintesis dan dirakit membentuk kristal parasporal. Daerah *non coding* pada sebagian gen *Cry* dan *Cyt*, terdapat urutan DNA yang ketika

ditranskripsi dapat meningkatkan stabilitas transkrip yang mengarah ke sintesis protein endotoksin tingkat tinggi. Hal ini dapat mengakibatkan kristal yang terbentuk menjadi lebih besar. Hal yang paling umum berlangsung dari proses ini adalah adanya pengulangan terbalik yang akhirnya akan membentuk struktur *loop-steam* stabil yang menghambat aksi 3-5 *exoribonucleases* (Federici *et al.*, 2006).

2.3 Karakterisasi Bobot Molekul Protein Melalui *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis* (SDS PAGE)

Elektroforesis adalah suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi dari suatu campuran berdasarkan kecepatan pergerakan partikel koloid yang bermuatan di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis banyak digunakan untuk analisa virus, asam nukleat, enzim, dan protein, serta molekul-molekul organik dengan bobot molekul rendah seperti asam amino. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Elektroforesis* (SDS PAGE) adalah teknik elektroforesis untuk memisahkan rantai polipeptida berdasarkan kemampuannya untuk bergerak dalam arus listrik. Kecepatan pergerakannya diengaruhi oleh panjang polipeptida atau bobot molekulnya. Rantai polipeptida yang panjang memiliki bobot molekul yang lebih besar akan bergerak lebih lambat dan sebaliknya rantai polipeptida pendek akan bergerak lebih cepat karena bobot molekulnya yang kecil (Izzah, 2014).

Keunggulan dari SDS PAGE adalah pita protein yang terbentuk menjadi lebih stabil karena adanya medium penyangga yaitu gel poliakrilamida yang bersifat transparan sehingga dapat diamati dengan mudah, menghasilkan resolusi yang lebih baik dan ukuran pori dapat diatur sehingga pemisahan protein dapat lebih optimal. Meskipun SDS PAGE paling sering digunakan dalam elektroforesis gel untuk analisis protein, tapi tidak dapat digunakan untuk menganalisa sejumlah protein kompleks, hal ini disebabkan karena protein yang telah di elektroforesis telah mengalami denaturasi (Izzah, 2014).

2.4 Kebun Raya Liwa

Kebun Raya Liwa (KRL) adalah kawasan konservasi tumbuhan *ex-situ* yang bertujuan untuk kegiatan konservasi, penelitian, pendidikan, wisata, dan jasa lingkungan. Saat ini KRL menjalankan fungsinya sebagai kebun raya daerah dengan tema tanaman hias Indonesia. Pengelolaan KRL diserahkan kepada Dinas Kehutanan sejak tahun 2007 sampai dengan tahun 2016 dan per 3 Januari 2017 pengelolaan KRL diserahkan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kabupaten Lampung Barat. KRL terletak di Desa Pekon Kubu Perahu, Kecamatan Balik Bukit, Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung, dengan luas lahan 86,68 ha. Di sisi barat, KRL berpadu dengan ekowisata Kubu Perahu Resort Balik Bukit, Taman Nasional Bukit Barisan Selatan (TNBBS). KRL terletak pada ketinggian 800-900 mdpl dengan kondisi tanah bergelombang dan lereng terjal. Kondisi iklim KRL meliputi curah hujan rata-rata tahunan 2500-3000 mm, bulan berlangsung basah 7 hingga 9 bulan, kelembaban relatif 50-80%, dan intensitas cahaya matahari sebesar 37,9%. Terdapat pembagian wilayah taman pada KRL meliputi beberapa taman dan taman tematik yaitu taman tematik buah, taman tematik hias, taman tematik wangi, taman tematik aren, taman pelangi, taman sakura, taman cinta, taman plaza penerima, taman tematik *Arecaceae*, taman tematik *Portulacaceae*, taman tematik kopi, dan taman tematik bambu (Wilyasari *et al.*, 2020).

Kebun Raya Liwa adalah sebagai tempat pengolahan tanaman hias di Liwa Kabupaten Lampung Barat memiliki kondisi topografi yang beragam yakni berupa punggung bukit (*ridge*), lembah (*valley*), tanah cekung (*convex*), tanah cembung (*concave*), dan sedikit tanah datar (*flat*) dan menjadi lokasi strategis sebagai salah satu objek wisata utama di Kabupaten Lampung Barat (Munawaroh, 2018). Kebun Raya Liwa sebagai kawasan perbukitan dengan kondisi tanah yang berbeda-beda yang mengakibatkan adanya pertumbuhan berbagai jenis mikroorganisme yang dapat digunakan pula untuk konservasi, penelitian, pendidikan, dan wisata (Royanti *et al.*, 2023).

III. METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung serta di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan yang dimulai pada bulan November 2022 hingga Maret 2023.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri atas 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*, *micro sentrifuge*, *vortex mixer*, mikropipet, autoklaf, *shaker incubator*, Seperangkat SDS PAGE.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu 5 isolat *Bacillus thuringiensis* dengan kode Bt 2, Bt 3, Bt 5, Bt 6 dan Bt 7 koleksi laboratorium mikrobiologi Universitas Lampung, media Luria Bertani, media T3,, NaCL 1%, SDS 1%, β -merkaptotanol, triptosa, Reagen A dan B Lowry, BSA (*bovine serum albumin*), *folin ciocalteu*, spirtus, tisu, kapas, persulfat (sigma), *Folin Ciocalteu*, *coomassie brilliant blue*, glisin, dithiothreitol, Akril/bis akrilamida (sigma), ammonium persulfat (sigma), *coomassie brilliant blue*, glisin,

resolving buffer (1,5M Tris-HCl pH 8,8), *stacking buffer* (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), metanol, H₂SO₄, NH₄OH, Na₂CO₃, CuSO₄.5H₂O, Natrium kalium tartrat, *tetramethylethylenediamine* (TEMED), standar protein katalog #161-0318 (Bio-Rad).

3.3 Metode

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskripsi kualitatif untuk memperoleh gambaran tentang karakter protein toksin (endotoksin) yang disintesis oleh *B. thuringiensis*. Kajian literatur dilakukan dalam penelitian ini untuk membandingkan bobot molekul protein. Protein endotoksin yang dikaji dalam penelitian ini adalah edotoksin 5 isolat *B. thuringiensis* hasil penelitian Janah *et al.*, (2022). Setiap isolat diremajakan menggunakan media Luria Bertani lalu ditumbuhkan pada media spesifik T3. *Crude extract* isolate diperoleh dengan cara disentrifugasi berulang kali dan kemudian disuspensikan dalam SDS 1%, β-merkaptotanol. *Crude extract* yang telah diperoleh kemudian dikuantifikasi kadar proteinnya menggunakan metode *Lowry* dan ditentukan *profiling* protein toksin menggunakan elektroforesis SDS PAGE.

3.3.1 Preparasi Isolat

Isolat *Bacillus* sp yang digunakan adalah isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang diisolasi dari tanah Kebun Raya Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Lampung, terdiri dari isolat Bt2, Bt3, Bt5, Bt6 dan Bt7. Media Luria Bertani (Park *et al.*, 2017) digunakan sebagai media tumbuh untuk meremajakan isolat. Dalam 1 liter media Luria Bertani mengandung 10 gram tripton, 5 gram *yeast extract*, 10 gram NaCl dalam 15 gram agar (Shiddiqi *et al.*, 2013).

Peremajaan isolat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolate secara aseptis ke dalam media Luria Bertani agar miring dengan metode *streak* dan diinkubasi pada suhu ruang selama \pm 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati sampai diperoleh koloni yang seragam. Isolat hasil peremajaan selanjutnya diinokulasikan dalam media T3 agar (setiap liter pelarut mengandung 16 gram nutrient broth, 2 gram KCl, 0,5 gram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mL glukosa 50 %, 1 mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M, 1 mL MnCl_2 0,1 M, 1 mL FeSO_4 1 mM dalam 17 gram agar), kemudian diinkubasi hingga terjadi sporulasi selama 48 - 72 jam.

3.3.2 Isolasi Protein Toksin

Spora *B. thuringiensis* dalam media T3 dipindahkan menggunakan ose ke dalam *microtube* 1,5 mL yang diisi 1 mL NaCl 0,5 M dingin, kemudian isolat direndam dalam es lalu dikocok hingga menjadi suspensi homogen.

Suspensi disentrifugasi pada 13000g selama 10 menit. Supernatan dibuang dan hanya disisakan pelet pada *microtube*. Pelet dicuci dengan 1 mL NaCl 1% dan diresuspensi dengan 140 μl campuran 1% SDS 0,01 % β -*merkaptoetanol* kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit. Suspensi kemudian disentrifugasi kembali pada 10000 x g selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan yang merupakan *crude extracts* protein.

3.3.3 Kuantifikasi Kadar Protein

Sebanyak 400 μl *crude extract* atau pelet isolat ditambahkan ke dalam 400 μl *Lowry Concentrate 2x* yang berisi Reagen A (20 gram Na_2CO_3 dalam 260 mL dH_2O , 0,4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 20 mL H_2O dan Reagen B (0,2 gram Na.K. *tartrate* dalam 20 mL H_2O , 4 gram NaOH dalam 100 mL H_2O). Kemudian diinkubasi pada suhu ruang, \pm 10 menit. Selanjutnya, ke dalam suspensi ditambahkan 200 μl 0,2 N *Folin Ciocalteu*, lalu dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi 30 menit pada suhu ruang. Kandungan protein diukur dengan spektrofotometer pada panjang

gelombang 595 nm. Sebagai pembanding digunakan larutan BSA (*bovine serum albumin*).

3.3.4 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin*

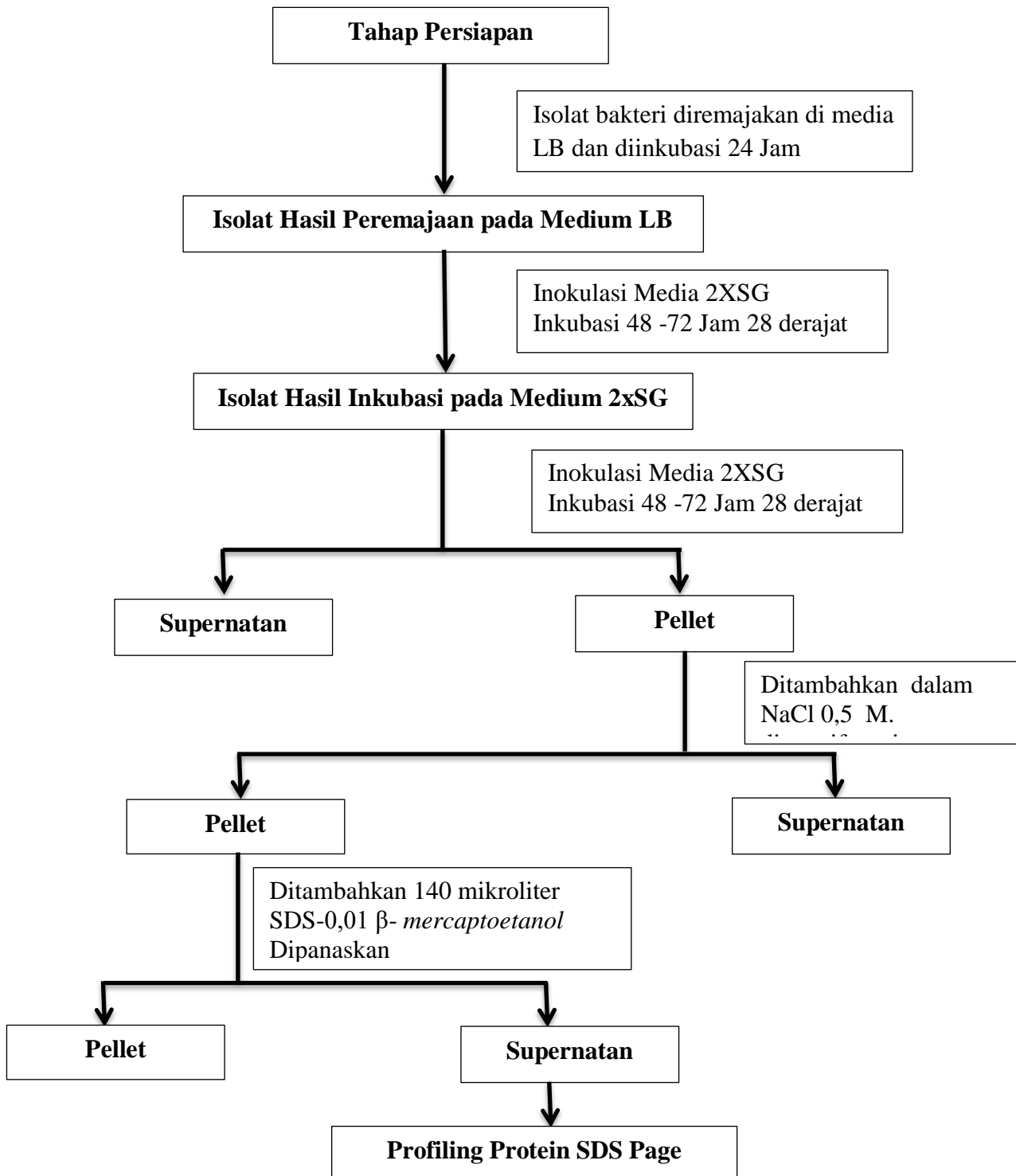
Bovine Serum Albumin (BSA) sebanyak 100 mg dilarutkan ke dalam 100 ml ddH₂O sehingga diperoleh larutan stok BSA 1 mg/ml. Selanjutnya dibuat seri pengenceran larutan standar dengan konsentrasi 0 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,04 mg/ml; 0,06 mg/ml; 0,08 mg/ml; dan 0,1 mg/ml. Dari masing-masing konsentrasi diambil 0,1 ml larutan standar dan selanjutnya ditambahkan 5 ml larutan *Bradford*, didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada λ 595 nm. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Microsoft excel* untuk mendapatkan kurva standar dengan persamaan regresi linier $y = mx + c$ (keterangan : y: absorbansi; m: *slope*; x: konsentrasi protein, dan c: *intercept*).

3.3.5 Analisis Bobot Molekul Protein dengan *SDS-PAGE*

Elektroforesis SDS PAGE dilakukan menggunakan metode standar dengan alat *Mini-Protean II Slab Cell Electrophoresis* (Bio Rad). Sampel protein (*crude extract*) didenaturasi dengan *buffer* (Tris-Cl 150 mM pH 6.8, SDS 6.25%, merkaptoetanol, gliserol 25%, *bromophenol blue* 2,5 mM) dengan perbandingan protein dan *buffer* 2:1. Sampel kemudian dididihkan selama 10 menit serta disentrifugasi pada kecepatan 10000 x g selama 5 menit. Elektroforesis poliakrilamid disiapkan. Gel poliakrilamid dibuat dari larutan stok akrilamid dan bisakrilamida (30%T, 2,67C), *stacking buffer* (Tris-HCl 0,5M pH 6.8), *resolving buffer* (Tris-HCl 1,5M pH 8.8), 10%SDS, APS dan TEMED sebagai katalis. Setelah gel bagian bawah (*resolving gel*) terbentuk, *stacking gel* dimasukkan di bagian atasnya dan dibuat cetakan untuk menempatkan protein sampel. Formulasi gel untuk *resolving gel* adalah 12% sedangkan untuk *stacking gel* adalah 4%. Elektroforesis sampel dilakukan pada tegangan 150 volt selama 60 menit berikut *protein marker*

sebagai pembanding. Untuk *staining* protein digunakan *Coomassie brilliant blue* 0.1% (w/v). Hasil *staining* dicuci dalam larutan metanol : asam asetat (40%:7.5%). Protein yang telah diproses melalui *destaining* difoto dengan kamera digital untuk analisa lebih lanjut.

3.4 Diagram Alir Penelitian



V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diperoleh kesimpulan bahwa protein toksin yang dihasilkan oleh isolat Bt2, Bt3, Bt6 dan Bt7 memiliki bobot molekul yang cenderung sama yakni berkisar 110.59 kDa dan diduga sebagai protein berjenis *CryIA* , sedangkan sampel Bt5 menghasilkan asumsi bobot molekul yang berbeda yakni sebesar 76.97 dengan dugaan menunjukkan protein yang berjenis *Cry 22*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan aktivitas dari protein toksin isolat *B. thuringiensis* asal Kebun Raya Liwa terhadap beberapa ordo serangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdulgani, H. T. R. dan N. (2013). Pengaruh Salinitas terhadap Kandungan Protein dan. *Jurna Sains Dan Seni Pomits Vol. 2, No.2, (2013)*, 2(2), 177–181. Kata Kunci—Ikan Bawal Bintang (*Trachinotus blochii*), kandungan protein, pertumbuhan, salinitas
- Al-Thani, A., Ashfaq, M. Y., Al-Thani, R., Hassan, Z. U., & Jaoua, S. (2022). 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(June), 101134. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101134>
- Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., & Bravo, A. (1996). Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 68(3), 203–212. <https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0087>
- Arrieta, G., Hernández, A., & Espinoza, A. M. (2004). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 757–764. <https://doi.org/10.15517/rbt.v1i2.15412>
- Bahri, S., Zulkifli, L., Citra Rasmi, D. A., & Sedijani, P. (2022). Isolation, Purification, and Toxicity Test of *Bacillus thuringiensis* from Cows Cage Soil Against *Drosophila melanogaster*. *Jurnal Biologi Tropis*, 21(3), 1106–1114. <https://doi.org/10.29303/jbt.v21i3.3221>
- Berbert-Molina, M. A., Prata, A. M. R., Pessanha, L. G., & Silveira, M. M. (2008). Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1397–1404. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0439-1>
- Cheng, B. Y. M., Carbonell, J. G., & Klein-Seetharaman, J. (2005). Protein classification based on text document classification techniques. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 58(4), 955–970. <https://doi.org/10.1002/prot.20373>
- Federici, B. A., Park, H. W., & Sakano, Y. (2006). Prokaryote Inclusions: Descriptions and Discoveries. In *Insecticidal protein crystals of Bacillus thuringiensis. In Inclusions in prokaryotes*.
- Izzah, A. N. (2014). *Perbandingan antara Metode SYBR Green dan Metode Hydrolysis Probe dalam Analisis DNA Gelatin Sapi dan DNA Gelatin Babi*

dengan Menggunakan Real Time PCR SKRIPSI. UIN SYARIF
HIDAYATULLAH JAKARTA.

- Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, *138*, 602–617.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.096>
- Jusuf, E. (2009). Exploration of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin Derived from Bacterial Isolates in Jabodetabek Region. *Microbiology Indonesia*, *3*(2), 51–55. <https://doi.org/10.5454/mi.3.2.1>
- Kitada, S., Abe, Y., Ito, A., Kuge, O., Akao, T., & Mizuki, E. (2005). Molecular Identification and Cytocidal Action of Parasporin, a Protein Group of Novel Crystal Toxins Targeting Human Cancer Cells. *6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus Thuringiensis and Its Environmental Impact*, 6–10.
- Lazarte, J. N., Valacco, M. P., Moreno, S., Salerno, G. L., & Berón, C. M. (2021). Molecular characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain from Argentina, toxic against Lepidoptera and Coleoptera, based on its whole-genome and Cry protein analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, *183*(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107563>
- 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.
<https://doi.org/10.12962/j23373520.v6i2.27447>
- Masta, N. (2020). Buku Materi Pembelajaran Scanning Electron Microscopy. *Patra Widya: Seri Penerbitan Penelitian Sejarah Dan Budaya.*, *21*(3), i–iii.
- Melo, A. L. D. A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2016). *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *36*(2), 317–326.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- Munawaroh, E. (2018). Upaya Konservasi Eks-Situ Famili Begoniaceae Dari Taman Nasional Bukit Barisan Selatan Di Kebun Raya Liwa, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung. *Florea : Jurnal Biologi Dan Pembelajarannya*, *5*(1), 44. <https://doi.org/10.25273/florea.v5i1.2504>
- Norris, J. R. (1964). The Classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl Bact*, *27*(3), 439–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.1962.tb13878.x>
- Ohba, M., Mizuki, E., & Uemori, A. (2009). Parasporin, A new Anticancer Protein Group From *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, *29*(1), 427–433.
- Park, S., Kim, C., Lee, D., Song, H., Cheon, K., Lee, H., Kim, S., Kim, J., & Lee,

- S. (2017). Construction of *Bacillus thuringiensis* Simulant Strains Suitable for Environmental Release. *Applied and Environmental Microbiology Aem.Asm*, 83(9), 1–16.
- Patel, K. D., Chudasama, C. J., & Ingle, S. S. (2012). Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from diverse habitats of India. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 437–445.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201100080>
- Petrey, D., & Honig, B. (2009). Is protein classification necessary? Toward alternative approaches to function annotation. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(3), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.001>
- Pujiastuti, Y., Astuti, D. T., Afriyani, S. R., Suparman, S., Irsan, C., Sembiring, E. R., Nugraha, S., Mulawarman, & Damiri, N. (2018). Characterization of *Bacillus thuringiensis* Berl. indigenous from soil and its potency as biological agents of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012064>
- Royanti, V., Handayani, K., & Ekowati, C. N. (2023). Isolasi Dan Karakterisasi *Bacillus Lipolitik* Dari Tanah. *Seminar Nasional Biologi*, 18, 40–45.
- Salaki, C. L., Situmorang, J., Sembiring, L., & Niken, S. N. (2019). Uji Patogenesis Isolat Bakteri Indigenous (*Bacillus thuringiensis*) terhadap Serangga Hama Kubis (*Crociodomia binotalis* Zell) Pendahuluan Metode Penelitian Tempat dan Waktu Penelitian. *Biota*, 14(3), 192–197.
- Sansinenea, E. (2016). *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (E. Sansinenea (ed.); 1st ed.). Springer.
- Sauka, D. H., Basurto-Ríos, R. E., Ibarrera, J. E., & Benintende, G. B. (2010). Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain. *Neotropical Entomology*, 39(5), 767–773.
<https://doi.org/10.1590/S1519-566X2010000500016>
- 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>
- Shiddiqi, M. H., Hermanto, S., & Jusuf, E. (2013a). *Bacillus thuringiensis* merupakan suatu jenis bakteri gram positif yang terdiri dari sejumlah. *Jurnal Kimia VALENSI*, 3(1).
- Shiddiqi, M. H., Hermanto, S., & Jusuf, E. (2013b). Eksplorasi Protein Toksin *Bacillus thuringiensis* dari Tanah di Kabupaten Tangerang. *Jurnal Kimia VALENSI*, 3(1). <https://doi.org/10.15408/jkv.v3i1.329>
- Shinkawa, A., Yaoi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H., & Sato, R. (1999). Binding of phylogenetically distant *Bacillus thuringiensis*

Cry toxins to a *Bombyx mori* aminopeptidase N suggests importance of Cry toxin's conserved structure in receptor binding. *Current Microbiology*, 39(1), 14–20. <https://doi.org/10.1007/PL00006820>

- Syahputra, G., Ambarsari L, & T, S. (2014). Simulasi docking kurkumin enol, bisdemetoksikurkumin dan analognya sebagai inhibitor enzim12-lipoksigenase. *Biofisika*, 10(1), 55–67.
- 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>
- Wilyasari, R. S., Yulianty, Y., Zulkifli, Z., & Nurcahyani, E. (2020). Morphological Characteristics of Araceae Plants in Liwa Botanical Garden, West Lampung. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen Dan Keanekaragaman Hayati*, 7(1), 35–40. <https://doi.org/10.23960/jbekh.v7i1.13>
- Yasutake, K., Binh, N. D., Kagoshima, K., Uemori, A., Ohgushi, A., Maeda, M., Mizuki, E., Yu, Y. M., & Ohba, M. (2006). Occurrence of parasporin-Producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(4), 365–372. <https://doi.org/10.1139/W05-134>
- Zhaolei, L., Naishun, B., Xueping, C., Jun, C., Manqiu, X., Zhiping, S., Ming, N., & Changming, F. (2018). Soil incubation studies with Cry1Ac protein indicate no adverse effect of Bt crops on soil microbial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 152(December 2017), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.054>