

APLIKASI METODE ARDRA DALAM IDENTIFIKASI ISOLAT *Bacillus thuringiensis* ENDOGENIK SEBAGAI PENGENDALI HAMA KUBIS (*Crociodolomia binotalis*)

APPLICATION OF ARDRA METHOD TO IDENTIFY INDIGENOUS *Bacillus thuringiensis* ISOLATES FOR *Crociodolomia binotalis* BIOCONTROL AGENT

Christina L. Salaki¹ dan Langkah Sembiring²

¹Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Unsrat, Manado,

²Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi UGM

ABSTRACT

Indonesian indigenous bacterial isolates of *B. thuringiensis* pathogenic to cabbage pest (*C. binotalis*) were molecularly characterized and identified using DNA fingerprinting method of ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Chromosomal DNA of 10 selected isolates (SLK2.3, SRNG4.2, TKO1, TK9, YPPA1, UG1A, BLPPN8.2, YWKA1, BAU3.2, LPST1) and 2 reference strains (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 & *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14) were isolated and purified by standard method. 16S rRNA genes were amplified by PCR method using universal primers of 27f and 1529r. PCR products were digested by 4 restriction endonucleases (*Eco*R1, *Hind*III, *Pst*I dan *Hae*III), and separated by agarose electrophoresis method to generate ARDRA profiles. Results of study showed that only ARDRA profiles generated by *Hae* III digestion were found to be meaningful and therefore used to identify the isolates. The ARDRA profile analysis indicated that the reference strain of *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 could be clearly separated with *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14. In fact, those two strains have been widely recognized to be different in terms of their pathogenic specificity against insects. *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 has been known to be specifically pathogenic to Lepidopteran whereas *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14 has been known to be specifically pathogenic to Dipteran.

Key words : application, ARDRA, indigenous, *B. thuringiensis*, *C. binotalis*

ABSTRAK

Isolat bakteri *Bacillus thuringiensis* endogenik Indonesia yang patogenik terhadap hama kubis (*Crociodolomia binotalis* Zell.) dikarakterisasi dan diidentifikasi secara molekular dengan menggunakan metode sidik jari DNA (ARDRA : *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). DNA kromosomal 10 isolat terpilih (SLK2.3, SRNG4.2, TKO1, TK9, YPPA1, UG1A, BLPPN8.2, YWKA1, BAU3.2, LPST1) dan 2 strain acuan (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 dan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14) diisolasi dan dipurifikasi dengan metode standar. Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan primer universal 27f dan 1529r. Produk PCR yang berupa gen 16S rRNA didigesti dengan 4 macam enzim restriksi (*Eco*R1, *Hind*III, *Pst*I dan *Hae*III). Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya profil ARDRA yang dihasilkan oleh enzim *Hae*III yang memberikan makna sehingga profil tersebutlah yang digunakan untuk melakukan identifikasi isolat yang diteliti. Analisis profil ARDRA menunjukkan bahwa strain acuan *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 dapat dibedakan secara tegas dan jelas dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14. Padahal kedua strain ini memang telah dikenal secara luas merupakan dua strain yang berbeda dalam hal spesifitas patogenisitas terhadap kelompok serangga. Bakteri *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* dikenal patogenik terhadap kelompok serangga anggota ordo Lepidoptera sedangkan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* dikenal patogenik terhadap kelompok serangga anggota ordo Diptera.

Kata kunci: identifikasi, ARDRA, *B. thuringiensis*, endogenik *C. binotalis*

PENDAHULUAN

Karakterisasi molekular merupakan karakterisasi dengan menggunakan data molekular yang salah satunya dapat digunakan dalam identifikasi mikrobial adalah asam nukleat. Analisis asam nukleat meliputi analisis plasmid DNA, analisis DNA kromosomal, hibridisasi DNA, DNA *fingerprinting*, prosedur amplifikasi dan teknik *sequencing* (Towner, K.J. and A. Cockayne., 1995).

Metode fenotipik belum tentu cukup memberikan informasi yang jelas dalam membedakan strain intra-spesies dan inter-species. Oleh karena itu, dibutuhkan metode molekular untuk memperoleh informasi yang lebih akurat [Singh *et. al.*, 2009]. Analisis *phylogenetic-tree* berdasarkan sekuen gen 16S rRNA sering dipakai sebagai metode untuk mengklasifikasikan bakteri dan arkaeal. Sekuen gen 16S rRNA pada bakteri merupakan marker molekular universal yang baik karena (i) mengandung daerah yang sangat stabil (*conserved region*) maupun daerah yang variabel (ii) jarang sekali mengalami transfer gen secara lateral dan (iii) mengalami perubahan evolusioner yang sangat lambat sehingga dapat digunakan untuk mengetahui hubungan filogenetik (Atlas and Bartha, 1997; Joung and Cote, 2001). Klasifikasi bakteri secara filogenetik sangat dibutuhkan terutama untuk bakteri patogenik karena bakteri yang memiliki kedekatan hubungan kekerabatan dapat dikelompokkan sebagai suatu genus atau spesies sehingga dapat terhindar dari pengklasifikasian yang tidak tepat dan kesalahan dalam identifikasi (Liu *et. al.*, 1991).

Analisis filogenetik molekular yang didasarkan atas gen 16S rRNA dapat digunakan untuk tujuan klasifikasi maupun identifikasi mikrobial dan terbukti mampu menyingkap keanekaragaman genetik bakteri *B. thuringiensis* seperti yang dilaporkan oleh sejumlah peneliti (Carozzi *et. al.*, 1991; Borque *et. al.*, 1993; Brousseau *et. al.*, 1993; Nakamura, 1994; Priest *et. al.*, 1994; Southern, 1995; Arkhust *et. al.*, 1997; Hansen *et. al.*, 1998; Joung and Cote, 2001).

Di samping analisis filogenetik molekular, sidikjari DNA juga terbukti mampu memisahkan dan mengidentifikasi strain bakteri pada umumnya (Towner and Cockayne, 1995) maupun strain anggota spesies *B. thuringiensis* pada khususnya (Joung and Cote, 2001; Priest *et. al.*, 1994). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat

B. thuringiensis endogenik Indonesia yang berpotensi sebagai agen pengendali hayati bagi hama kubis (*C. binotalis*) dengan menggunakan metode sidikjari DNA berdasarkan profil ARDRA.

METODE PENELITIAN

Isolasi DNA Kromosomal Mikrobial Uji

Isolat *B. thuringiensis* endogenik Indonesia yang berpotensi sebagai agen pengendali hayati bagi hama kubis (*C. binotalis*) diperoleh dari penelitian sebelumnya (Salaki *et. al.*, 2010). Strain acuan berupa *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14 dan *B. thuringiensis* serovar HD1 diperoleh dari Laboratorium Entomologi Fakultas Biologi UGM.

Strain bakteri ditumbuhkan dalam media Luria Bertani (LB) pada suhu 30°C selama semalam. Sebanyak 2 ml kultur cair dimasukkan ke dalam tabung ependorf steril. Suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 400 µl (75mM NaCl; 25 mM EDTA; 20 mM TRIS-HCl pH 7,5) dan Lisozim 50 µl (100 mg/ml) kemudian dicampur dan diinkubasikan pada *waterbath* 37°C selama satu jam. Sesudah diinkubasikan lalu ditambahkan 10 µl larutan 20 mg/ml proteinase-K kemudian suspensi tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu jam. Selanjutnya ditambahkan 50 µl SDS 10 % dan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 1 jam, kemudian tambahkan 167 µl NaCl 5 M dan inkubasikan pada 65°C selama satu jam. Sesudah inkubasi ditambahkan 400 µl kloroform dingin, diinkubasikan pada suhu ruang selama 30 menit kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf bersih kemudian ditambahkan 200 µl kloroform dingin, disentrifugasi pada 13.000 rpm selama lima menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf bersih. Selanjutnya ditambahkan isopropanol (2D-propanol) kemudian inkubasikan semalam pada suhu -20°C. Supernatan tersebut setelah diinkubasikan kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama lima menit. Supernatan dibuang. Kemudian ditambahkan 100 ml etanol 70 % dingin kemudian disentrifugasikan sebentar. Etanol dibuang kemudian pelet dikeringanginkan dan ditambahkan 20-80 µl TE. Suspensi DNA ini disimpan pada -20°C untuk selanjutnya digunakan sebagai template dalam amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR.

Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan metode PCR

DNA kromosomal masing-masing strain bakteri hasil isolasi disentrifugasi pada 3.000 rpm selama lima menit, kemudian digunakan sebagai cetakan dalam amplifikasi gen 16S rRNA yang mengkode 16S rRNA dengan *Thermocycler Gene Cycler* (Biorad). Amplifikasi 16S rDNA dilakukan dengan menggunakan kit *MegaMix Blue* (Microzone Ltd). Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA adalah primer 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan 1529R (5-CAIAAACGACGTGATCC-3) yang merupakan primer universal untuk berbagai strain bakteri. Primer ini komplementer dengan ujung 16S rDNA dari semua strain dan menghasilkan *band* tunggal dengan panjang sekitar 1500 bp. Primer ini berkesesuaian dengan daerah *conserved* pada gen 16S rDNA dan dapat mengamplifikasi *sequence* 16S rDNA pada berbagai jenis bakteri (Al Jassim *et al.*, 2005; Osborn and Smith, 2005).

DNA kromosomal yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan PCR [Brousseau *et al.*, 1993; Ceron *et al.*, 1994]. Konsentrasi dan komposisi zat-zat yang dipakai untuk reaksi PCR dalam *Thin Tube* (Tabung untuk PCR) yaitu MMB 22 µl, DNA template 1 µl (0,012 - 0,106 ng/µl) serta ditambahkan Primer 2 µl (20 pmol) untuk total volume 25 µl. Tabung-tabung PCR yang berisi sampel tersebut ditempatkan dalam *Gen Cycler*. Program untuk amplifikasi gen 16S rRNA disajikan dalam Tabel 1.

Purifikasi Amplikon gen 16S rRNA

Sampel 16S rDNA masing-masing strain bakteri hasil PCR dimurnikan dengan menggunakan Kit *Microclean*. Produk PCR sebanyak 25 µl ditambahkan *Microclean* dengan perbandingan 1:1, dicampur dengan menggunakan *pipetting*. Diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 menit. Supernatan dibuang kemudian disentrifugasikan sebentar. Supernatan yang tersisa dibuang. Pelet diresuspensikan dengan TE 30-40 µl lalu disimpan pada -20°C untuk selanjutnya digunakan dalam analisis ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*).

ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) 16S rDNA

Analisis fragmen restriksi gen 16S rRNA dilakukan dengan metode ARDRA (9). Setiap amplikon gen 16S rRNA murni sebanyak 17 µl kemudian ditambahkan dua mikroliter *buffer* enzim restriksi, 2,5 µl akuabides bebas nuklease, serta 1 µl (10 unit) masing-masing enzim restriksi yaitu *HindIII*, *EcoRI*, *PstI* dan *HaeIII*. Setiap campuran enzim restriksi tersebut selanjutnya diinkubasikan selama dua jam pada suhu 37°C dalam penangas air. Restriksi DNA tersebut dihentikan dengan penambahan lima mikroliter *loading dye* (*blue juice*) dan dipanaskan pada 65°C selama lima menit dalam penangas air. Pola fragmen restriksi gen 16S rDNA sampel tiga mikroliter dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2 % (w/v) (dalam tabung 1µg ml⁻¹ Ethidium bromide pada 40mA dalam TAE buffer (Tris acetate 0,04 mol l⁻¹, EDTA 0,001 l⁻¹). DNA Lambda digunakan sebagai penanda ukuran fragmen DNA Linier. Pola pita fragmen 16S rDNA pada gel agarosa diamati dengan *UV Illuminator* kemudian difoto dengan kamera digital. Foto profil pita fragmen 16S rDNA kemudian dikonversikan menjadi diagram representatif dengan program *Paintshop Pro*.

Profil fragmen gen 16S rRNA hasil restriksi digunakan untuk mengidentifikasi strain uji dengan membandingkannya pada strain acuan. Mengingat bahwa profil ARDRA cukup sederhana dan dapat dianalisis secara visual maka tidak dilakukan analisis kuantitatif dengan bantuan sistematik numerik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi dan Identifikasi dengan ARDRA

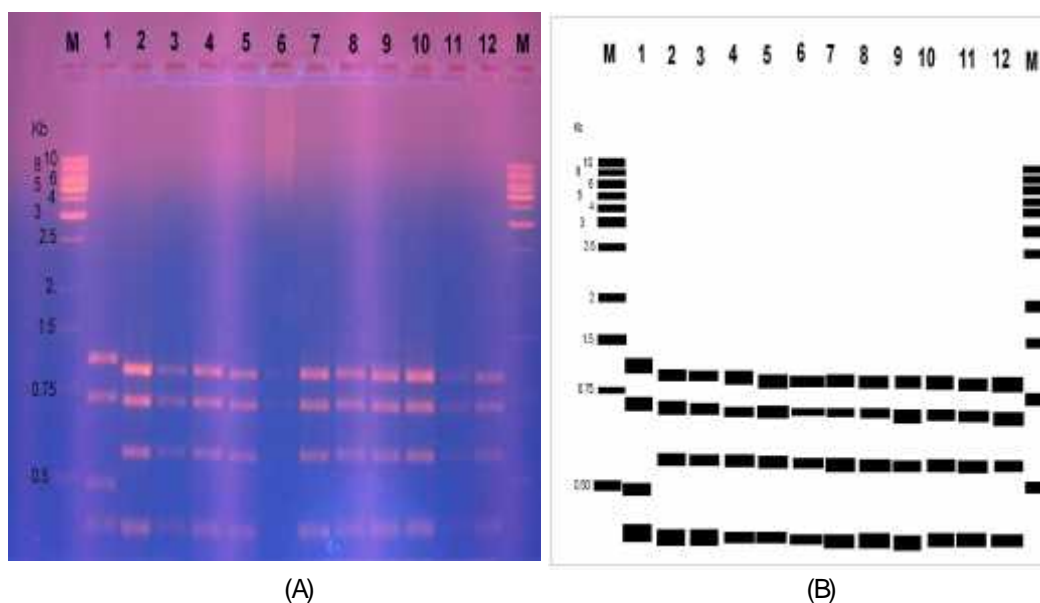
Sekuen 16S rDNA hasil PCR dengan ukuran sekitar 1500 bp (pasangan basa) dari masing-masing strain bakteri uji yang dipotong dengan enzim *PstI* dan *HaeIII* disajikan pada Gambar 1.

Dalam penelitian ini digunakan enzim restriksi *PstI*, *HindIII*, *EcoRI* dan *HaeIII*. Hanya enzim *HaeIII* yang dapat menghasilkan fragmen-fragmen 16S rDNA untuk membedakan beberapa kelompok strain bakteri, sedangkan enzim *EcoRI* hanya menghasilkan satu kelompok strain.

Tabel 1. Kondisi Reaksi PCR untuk amplifikasi gen 16S rRNA.

(Table 1. Condition of PCR Reaction for 16S rRNA gene amplification)

No	Komponen	Suhu (°C)	Waktu (menit)
1.	Denaturasi Awal	94	5
2.	30 siklus : Denaturasi	94	1
	Annealing	55	1
	Ekstensi	72	1
3.	Ekstensi Akhir	72	10
4.	Ekstensi akhir	72	5

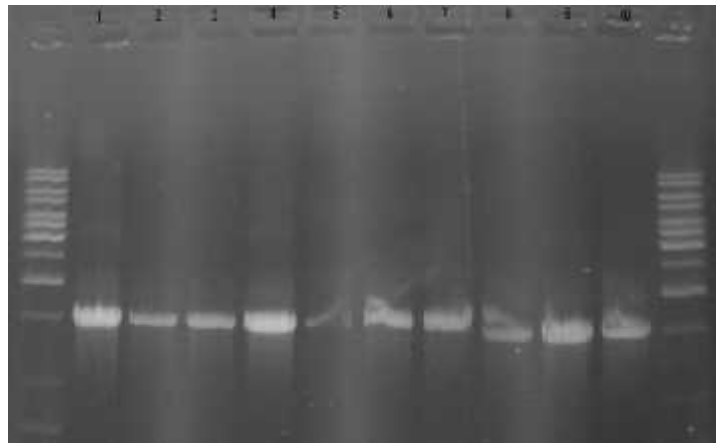


Gambar 1. (A) Profil ARDRA gen 16S rRNA isolat *B. thuringiensis* dan strain acuan yang didigesti dengan enzim *Hae* III. (B). Diagram representatif Profil ARDRA gen 16S rRNA strain *B. thuringiensis* dan strain acuan yang didigesti dengan enzim *Hae* III. **Lajur 1.** (*B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14); **Lajur 2.** (SLK2.3); **Lajur 3.** (SRNG4.2); **Lajur 4.** (TKO1); **Lajur 5.** (TK9); **Lajur 6.** (YPPA.1); **Lajur 7.** (UG1A); **Lajur 8.** (BLPPN8.2); **Lajur 9.** (YVKA.1); **Lajur 10.** (BAU3.2); **Lajur 11.** (LPST.1); **Lajur 12.** (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1); **M** (Marker Berat Molekul)

Figure 1. (A) ARDRA profile of 16S rRNA gene of *B. thuringiensis* isolates and reference strains digested with *Hae* III (B) Representative diagram of ARDRA profile of *B. thuringiensis* isolates and reference strains digested with *Hae* III. **Lane 1.** (*B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14); **Lane 2.** (SLK2.3); **Lane 3.** (SRNG4.2); **Lane 4.** (TKO1); **Lane 5.** (TK9); **Lane 6.** (YPPA.1); **Lane 7.** (UG1A); **Lane 8.** (BLPPN8.2); **Lane 9.** (YVKA.1); **Lane 10.** (BAU3.2); **Lane 11.** (LPST.1); **Lane 12.** (*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1); **M** (Molecular Weight Marker)

Profil sidikjari DNA yang dihasilkan dari analisis restriksi gen 16S rRNA dengan enzim *Hae*III menunjukkan bahwa strain acuan dapat dibedakan secara jelas dan tegas berdasarkan perbedaan dua pita DNA spesifik yang dimiliki oleh strain acuan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14 tetapi tidak dimiliki oleh strain acuan *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1 maupun semua isolat uji. Namun demikian, profil tersebut tidak mampu membedakan antara sesama isolat uji

maupun dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1. Artinya, analisis ini menunjukkan bahwa berdasarkan profil sidikjari DNA yang didasarkan atas data ARDRA dengan digesti menggunakan enzim *Hae*III maka semua isolat uji jelas berbeda dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14 tetapi sangat mirip dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1.



Gambar 2. Profil ARDRA gen 16S rRNA isolat *B. thuringiensis* dan strain acuan yang didigesti dengan enzim EcoRI. Lajur 1. (SLK2.3); Lajur 2. (SRNG4.2); Lajur 3. (TKO1); Lajur 4. (TK9); Lajur 5. (YPPA.1); Lajur 6. (UG1A); Lajur 7. (BLPPN8.2); Lajur 8. (YMKA.1); Lajur 9. (BAU3.2); Lajur 10. (LPST.1)

Figure 2. (A) ARDRA profile of 16S rRNA gene of *B. thuringiensis* isolates and reference strains digested with Eco RI. Lane 1. (SLK2.3); Lane 2. (SRNG4.2); Lane 3. (TKO1); Lane 4. (TK9); Lane 5. (YPPA.1); Lane 6. (UG1A); Lane 7. (BLPPN8.2); Lane 8. (YMKA.1); Lane 9. (BAU3.2); Lane 10. (LPST.1)

Artinya, berdasarkan hasil penelitian ini dapat dinyatakan bahwa semua isolat bakteri uji diidentifikasi sebagai anggota spesies *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*.

KESIMPULAN

Analisis ini menunjukkan bahwa berdasarkan profil sidikjari DNA yang dihasilkan dari metode ARDRA dengan menggunakan enzim *Hae*III maka semua isolat uji berbeda dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *israelensis* H14 tetapi sangat mirip dengan strain acuan *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD1.

DAFTAR PUSTAKA

- Al Jassim, R.A.M., P.T. Scott, A.L. Trebbin, D. Trott., & C.C. Pollitt. 2005. The Genetic Diversity of Lactic Acid Bacteria in The Equine Gastrointestinal Tract. *FEMS Microbiology Letters*. 248:75-81.
- Akhurst, R.J., E.W. Lyness, Q.Y. Zhang, D.J. Cooper., & D.E. Pinnock. 1997. A 16S rRNA Oligonucleotide Probe for Identification of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Sheep Fleece. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69:24-31.
- Atlas, R.M.& R. Bartha. 1997. *Microbial Ecology. Fundamental and Application*. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc. New York.
- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie., & R.C. Levesque. 1993. Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection and Differentiation of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology*. 59:523-527
- Brousseau, R., A. Saint-Onge, G. Prefontaine, L. Masson., J. Cabana. 1993. Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction, a Powerful Method to Identify *Bacillus thuringiensis* Serovars and Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:114-119
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola., & M.G. Koziel. 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles. *Applied Environmental Microbiology*. 57:3057-3061
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina. & A. Bravo. 1994. PCR Analysis of the *cry* I Insecticidal Crystal Family Genes From *Bacillus*

- thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (1):353-356.
- Hansen, B., P.H. Damgaard, J. Eilenberg, & J.C. Pedersen. 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71:106-114
- Joung, K.B. & J.C. Cote. 2001. Phylogenetic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Serovars Based on 16S rRNA Gene Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Journal of Applied Microbiology*. 90:115-122
- Liu, S., A.B. Schryvers, K.E. Sanderson, & R.N. Johnston. 1999. Bacterial Phylogenetic Clusters Revealed by Genome Structure. *Journal of Bacteriology*. 181(21):6747-6755.
- Nakamura, L.K. 1994. DNA Relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 4:125-129
- Nakamura, L.K. 1994. DNA Relatedness among *Bacillus thuringiensis* serovars. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 4:125-129
- Osborn, A.M. & C.J. Smith. 2005. *Molecular Microbial Ecology*. Taylor and Francis Group. Cromwell Press, Trowbridge, Wilts. UK
- Southern, E.M. 1975. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. 98:503-517
- Priest, F.G., Kaji, D.A, Y.B. Rosato., & V.P. Canhos. 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and Related Bacteria Ribosomal RNA Gene Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Microbiology*. 140:1015-1022
- Singh, S., P. Goswami, R. Sing., & K.J. Heller. 2009. Application of Molecular Identification Tools for Lactobacillus, with a Focus on Discrimination between Closely Related Species. *A Review. LWT-Food Science and Technology*. 42:448-457
- Towner, K.J. & A. Cockayne. 1995. *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*. Chapman & Hall. London

