

Karakterisasi Isolat *Bacillus thuringiensis* dari Beberapa Daerah di Jawa dan Sulawesi Selatan untuk Kontrol Biologi Lalat Myasis *Chrysomya bezziana*

S. MUHARSINI¹, APRIL H. WARDHANA¹, H. RUZAANI² dan B. AMIRHUSEIN²

¹Balai Penelitian Veteriner, PO Box 151, Bogor 16114

²Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor

(Diterima dewan redaksi 26 September 2003)

ABSTRACT

MUHARSINI, S., A. H. WARDHANA, H. RUZAANI and B. AMIRHUSEIN. 2003. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolat from several areas in Java and South Sulawesi for biological control of myasis, *Chrysomya bezziana*. *JITV* 8(4): 256-263.

Bacillus thuringiensis is a species of bacteria which has potential use for biological control of parasite. The aim of the study is to characterize the local isolate of *B. thuringiensis* using PCR technique. Primer of *cry* gen was used in the study. Two hundred and twenty seven soil samples were collected from several areas in Java Island and South Sulawesi Province. Samples were obtained from surrounding soils of animal housing and paddocks. Samples were inoculated in Nutrient Agar and the suspect of bacilli were then cultured in Luria Bertani acetic buffer. Seventy-three pure isolates of *Bacillus thuringiensis* were obtained. Thirty-five isolates from Bogor, Yogyakarta and Majalengka regencies were amplified using PCR and consisted of a *B. thuringiensis* sporulation gene which has a 850 bp band in an agarose gel. Amplification using *cry*IVA,B primers demonstrated four isolates contain a faint band of 800 bp and 12 isolates consist of a distinctive band of 300-400 bp. The results showed that several *B. thuringiensis* isolates containing a *cry* IV gen and those isolates are needed to be tested as a biological control agent for *Chrysomya bezziana*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Chrysomya bezziana*, biological control, *cry* IV gen

ABSTRAK

MUHARSINI, S., A. H. WARDHANA, H. RUZAANI dan B. AMIRHUSEIN. 2003. Karakterisasi isolat *Bacillus thuringiensis* dari beberapa daerah di Jawa dan Sulawesi Selatan untuk kontrol biologi lalat myasis *Chrysomya bezziana*. *JITV* 8(4): 256-263.

Bacillus thuringiensis adalah bakteri berbentuk batang yang mampu menghasilkan protein kristal toksik yang diharapkan dapat digunakan sebagai kontrol biologis terhadap parasit. Tujuan penelitian adalah karakterisasi isolat lokal *Bacillus thuringiensis* dengan menggunakan primer yang mengkode gen *cry* dengan teknik PCR. Sebanyak 227 sampel tanah yang dikoleksi dari beberapa daerah di Pulau Jawa dan Propinsi Sulawesi Selatan telah diisolasi. Sampel tanah diambil dari sekitar kandang ternak dan padang penggembalaan. Sampel tanah diinokulasi ke medium agar nutrisi, kemudian isolat bakteri yang berbentuk batang dimurnikan dengan ditanam pada medium Luria Bertani dapar asetat. Hasil pemurnian diperoleh 73 isolat *Bacillus thuringiensis*. Tiga puluh lima isolat dari Kabupaten Bogor, Yogyakarta dan Majalengka telah diamplifikasi dengan PCR, ternyata mempunyai gen *B. thuringiensis* sporulasi dengan ukuran 850 bp. Amplifikasi dengan menggunakan primer *cry* IVA, B menunjukkan bahwa empat isolat menghasilkan pita DNA samar yang berukuran 800 bp dan 12 isolat menunjukkan pita DNA terang yang berukuran 300-400 bp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa isolat *B. thuringiensis* mempunyai gen *cry*IV dan isolat-isolat tersebut perlu diuji efikasinya sebagai agen kontrol biologi terhadap lalat *Chrysomya bezziana*.

Kata kunci: *Bacillus thuringiensis*, *Chrysomya bezziana*, kontrol biologi, gen *cry* IV

PENDAHULUAN

Chrysomya bezziana atau the Old World Screwworm fly merupakan penyebab utama terjadinya penyakit myasis yang tersebar di kawasan Afrika bagian tropis dan subtropis, subkontinen India, Asia Tenggara termasuk Indonesia dan Papua New Guinea (NORRIS dan MURRAY, 1964; SPRADBERY dan VANNIASINGHAM, 1980; SIGIT dan PARTOUTOMO, 1981; SUKARSIH *et al.*, 1989; SPRADBERY dan KIRK, 1992). Masyarakat lebih mengenal penyakit ini dengan nama belatungan yaitu adanya infestasi larva lalat pada jaringan tubuh hewan maupun manusia. Larva ini bersifat obligat parasit dan

memakan jaringan hidup induk semang. Kasus myasis di Indonesia telah banyak dilaporkan yaitu di daerah Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Utara terutama pada ternak yang dipelihara secara semiintensif atau secara ekstensif bahkan prevalensinya mencapai 20% (MUCHLIS dan SUTIJONO, 1973; PARTOUTOMO, 2000). Penyakit ini sangat penting untuk ternak-ternak import yang ternyata lebih peka dibandingkan dengan ternak lokal. Sebanyak 10% sapi-sapi yang berasal dari Australia terserang penyakit ini (SIGIT dan PARTOUTOMO, 1981). Hal yang sama juga terjadi pada domba-domba Merino yang dipelihara secara intensif di daerah Bogor (SUKARSIH,

komunikasi pribadi). Disamping sapi Brahman, Brahman cross dan sapi Ongole, ternak lokal yang juga peka terhadap penyakit ini antara lain kuda sandelwood, babi, kambing dan domba lokal (SUKARSIH *et al.*, 1989).

Upaya pengendalian penyakit myasis sudah dilakukan dengan beberapa cara, antara lain pembuatan lalat jantan steril melalui radiasi, penggunaan preparat insektisida, pemakaian obat-obat tradisional, dan bahkan dengan vaksin rekombinan yang menggunakan bahan *peritrophic membrane* (SPRADBERY *et al.*, 1985; SUKARSIH *et al.*, 1989; PARTOUTOMO *et al.*, 1998; SUKARSIH *et al.*, 2000). Pengendalian myasis dengan cara pembuatan lalat jantan steril melalui radiasi memerlukan biaya dan fasilitas yang mahal. Preparat insektisida hanya memberikan proteksi yang pendek, sedangkan dengan obat tradisional kadang-kadang menimbulkan iritasi terhadap hewan. Hasil evaluasi terhadap vaksin rekombinan secara *in vitro* dan *in vivo* tidak menunjukkan tanggap kebal yang protektif. Oleh karena itu, penelitian pengendalian kasus myasis diarahkan pada kemungkinan dilakukannya kontrol biologis di lapang dengan menggunakan *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang, dengan ukuran lebar 1,0 - 1,2 µm dan panjang 3 - 5 µm. Bakteri ini merupakan salah satu anggota *B. cereus* grup bersama dengan *B. anthrax*. *B. thuringiensis* mempunyai ciri khusus yaitu kemampuannya untuk menghasilkan protein kristal protoksin intraseluler dari kelompok δ-endotoksin sehingga dapat dibedakan dengan *B. cereus* (BRAVO *et al.*, 1998). Endospora berbentuk oval hingga silindris, terletak parasentral atau terminal. Bakteri tersebut dapat nonmotil atau motil dengan adanya flagela tipe peritrik (HEIMPEL, 1967; BUCHANAN dan GIBBONS, 1974). Protein kristal sering disebut sebagai protein parasporal, berjumlah satu atau lebih dan tersusun secara paralel atau seri terhadap spora. Struktur protein kristal tersebut terletak di luar eksosporium dan terpisah dari endospora bakteri (KRIEG dan HOLT, 1984).

Pengembangan bioinsektisida *B. thuringiensis* didasarkan pada kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan protein kristal yang toksik terhadap insekta sasaran yang bersifat spesifik, namun tidak toksik terhadap tumbuhan, manusia maupun organisme yang bukan sasarannya. Beberapa isolat *B. thuringiensis* dari beberapa daerah di Indonesia telah dikoleksi dan diuji keefektifannya terhadap serangga hama dari berbagai jenis tanaman (BROTONEGORO *et al.*, 1997). Penelitian lain menunjukkan bahwa bakteri ini juga berpotensi sebagai kontrol biologis pada lalat peternakan antara lain *Hematobia irritans exigua*, *Lucilia cuprina*, *L. sericata*, *Musca domestica*, *Bovicola ovis* dan *Buffalo fly* (CHILCHOTT *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1998; GOUGH *et al.*, 2002). Namun sampai saat

ini belum ada laporan yang menyebutkan daya toksisitas *B. thuringiensis* terhadap lalat *C. bezziana*.

Perbedaan toksisitas protein kristal diantara strain *B. thuringiensis* ditentukan oleh gen *cry* yang terletak pada satu atau lebih plasmid dengan ukuran 45-225 kb (KRONSTAD dan WHITELEY, 1986). Gen *cry* dapat dikelompokkan berdasarkan hasil uji serotipe, ukuran dan bentuk kristal protein, uji efikasi terhadap insek sasaran, uji kimiawi dan uji sidik jari genom. Lebih dari 120 gen *cry* telah berhasil diklasifikasi berdasarkan pada homologi asam amino proteinnya. Kelompok gen *cryIV* menyandi protein sebesar 70-130 kDa dilaporkan sangat toksik terhadap ordo Diptera termasuk lalat (KRONSTAD dan WHITELEY, 1986).

Teknik PCR memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan jenis gen *cry* pada *B. thuringiensis* (BOURQUE *et al.*, 1993). Beberapa penelitian yang mampu membuktikan keefektifan teknik ini antara lain ditemukannya gen *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIIIA*, *cryIIIB*, *cryIVA* dan *cryIVB* dari berbagai subspecies dari strain *B. thuringiensis* (CAROZZI *et al.*, 1991; BOURQUE *et al.*, 1993). Dalam makalah ini diuraikan karakterisasi *B. thuringiensis* dengan menggunakan primer yang mengkode gen *cryIV* dengan teknik PCR. Isolat-isolat yang mempunyai gen *cry* diharapkan dapat dijadikan kandidat agen bioinsektisida terhadap lalat myasis *C. bezziana*.

MATERI DAN METODE

Koleksi sampel tanah

Sampel tanah dikoleksi dari beberapa daerah yaitu: Propinsi Jawa Barat, Jawa Tengah, Yogyakarta dan Sulawesi Selatan. Sampel tanah diambil dari lokasi sekitar kandang atau padang penggembalaan sapi, kambing, domba, kerbau dan kuda. Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik bersih berukuran 250 g, diberi label tanggal pengambilan, lokasi dan pemilik hewan.

Isolasi dan pemurnian bakteri

Sebanyak 10 g sampel tanah disuspensikan ke dalam 90 ml akuades steril dalam labu Erlenmeyer secara aseptik, dikocok 3 - 5 menit, dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 15 menit. Sebanyak 1 ml supernatan suspensi sampel tanah tersebut dipindahkan ke tabung berisi akuades steril dan diencerkan menjadi 10^{-1} - 10^{-6} . Sebanyak 0,1 ml supernatan yang telah diencerkan menjadi 10^{-3} dan 10^{-4} , diinokulasi pada medium *Nutrient Agar* (NA) dengan cara sebar pada seluruh permukaan agar menggunakan spatel *Drygalski* dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 1 - 2 hari hingga koloni bakteri tumbuh. Koloni bakteri dengan ciri

morfologi yang menunjukkan koloni *Bacillus* spp. yaitu berbentuk batang dan berspora dipindahkan ke medium NA yang baru, diberi nomor dan disimpan dalam ruang dingin bersuhu 4°C (BROTONEGORO *et al.*, 1997; WIDYASARI, 2001).

Isolat *B. thuringiensis* dipisahkan dari koloni isolat *Bacillus* spp. yaitu dengan cara sebanyak satu ose koloni bakteri *Bacillus* spp. dari medium NA diinokulasikan ke dalam 10 ml medium cair LB dapar asetat (0,25 M, pH 6,8). Kultur cair bakteri tersebut dibiarkan tumbuh selama 1 hari dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C. Kultur cair tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 5 menit. Setelah dingin, sebanyak 0,1 ml kultur cair disebar di atas medium LB padat pH 7,2 menggunakan spatel *Drygalski*. Setelah 1-2 hari koloni bakteri tersebut diperiksa di bawah mikroskop fase kontras dengan perbesaran 1000 x untuk mengamati adanya spora dan kristal protein. Setelah tumbuh dengan baik, bakteri disimpan dalam kamar dingin yang bersuhu 4°C untuk tahap penelitian selanjutnya.

Isolasi DNA

Isolat bakteri yang ditumbuhkan di media agar LB diambil dengan tusuk gigi steril sebesar kira-kira 1 koloni (diameter 1-2 mm). Isolat bakteri ini kemudian disuspensikan dengan 100 µl dH₂O steril dalam tabung ependorf dan dipecah (*lysis*) dengan dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit. Sisa-sisa sel bakteri kemudian diendapkan dengan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm (mikrosentrifus). Supernatan (yang telah mengandung DNA bakteri hasil *lysis*) yang dihasilkan disimpan pada suhu 4°C hingga saat diperlukan untuk uji PCR.

Karakterisasi bakteri *B. thuringiensis* dengan teknik PCR

Sebanyak 5 µl DNA template (lisat bakteri), 2,5 µl 10 x PCR buffer (PCR *core*, Promega), 2,5 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTP, 1,0 µl (5 pmol) masing-masing primer (Tabel 1), 0,2 µl (1 unit) Taq DNA polymerase dimasukkan ke dalam tabung ependorf volume 500 µl. PCR dilakukan pada volume total larutan 25 µl dengan

menambahkan 12,3 µl dH₂O. Amplifikasi menggunakan mesin PCR (PTC 100, M.J. Research) dengan metode yang digunakan oleh CAROZZI *et al.* (1991). Denaturasi awal: 94°C (2 menit, 45 detik), annealing 45°C (45 menit), ekstensi 72°C (1 menit dan 2 detik) perputaran. Tahap denaturasi lanjut pada suhu 94°C (45 detik), annealing (45 detik), ekstensi 72°C (1 menit) yang dilakukan sebanyak 35 siklus. Tahap akhir amplifikasi dilakukan pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR dipertahankan pada suhu akhir 4°C. Hasil PCR divisualisasi pada gel agarose 1,5% yang diwarnai dengan etidium bromida.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Selama penelitian berlangsung, telah diperoleh sebanyak 227 sampel tanah yang berasal dari Propinsi Jawa Barat, Yogyakarta dan Sulawesi Selatan (Tabel 2). Jawa Barat dan Sulawesi Selatan dipilih karena dua daerah tersebut adalah daerah endemik myasis yang disebabkan oleh lalat *C. bezziana* (SIGIT dan PARTOUTOMO, 1981; SUKARSIH *et al.*, 1989). Selain itu, penelitian HASTOWO *et al.* (1992) menunjukkan bahwa isolat *B. thuringiensis* ditemukan paling banyak pada sampel tanah dari Sulawesi Selatan dan Jawa Barat. Namun demikian sampel tanah juga diambil dari daerah lain yang belum terdapat laporan resmi kasus myasis.

Telah diperoleh 73 isolat *B. thuringiensis* (32,2%) selama penelitian ini. Isolat terbanyak diperoleh dari Kabupaten Bogor (131,2%), kemudian berturut-turut Kabupaten Sukabumi (50,0%), Yogyakarta (31,8%), Majalengka (31,7%) dan Sulawesi Selatan (14,6%). Tidak diperoleh isolat *B. thuringiensis* dari Kabupaten Cirebon (Tabel 2). Hasil isolat yang diperoleh bervariasi dari tiap-tiap lokasi pengambilan sampel tanah. Perbedaan kandungan *B. thuringiensis* dalam tanah dipengaruhi beberapa faktor antara lain tipe sampel tanah yang diteliti, kemampuan spora untuk bergerminasi dan kondisi geografi. Tanah dengan kisaran pH 6 - 6,5 lebih baik untuk ketahanan spora dibandingkan dengan pH 4 - 4,9 (PETRAS dan CASIDA, 1985). Kemampuan spora untuk bergerminasi tidak

Tabel 1. Primer yang digunakan beserta sekuensnya

Gen	Sekuens (5' - 3')	Hasil PCR (pb)	Pustaka
<i>Bt</i> SpoOA	AGG GAA TAA ATG AAC GAT AAA C	857	LERECLUS <i>et al.</i> , 1995
(gi: 520999)	TAA CCG AAT AAG GAC GAA ATA G		
<i>cry</i> IVA,B	CAA GCC GCA AAT CTT GTG GA	797	CAROZZI <i>et al.</i> , 1991
	ATG GCT TGT TTC GCT ACA TC		

dipengaruhi oleh pH tanah melainkan dipengaruhi oleh kelembaban tanah. Penelitian yang dilakukan oleh CHAK *et al.* (1994) di Taiwan menunjukkan bahwa 93,5% isolat *B. thuringiensis* diperoleh dari sampel tanah dari dataran tinggi, sedangkan hanya 6,5% diperoleh dari dataran rendah.

Berdasarkan hasil penelitian kandungan *B. thuringiensis* dari sampel tanah yang dikoleksi dari lokasi dengan geografi yang berbeda, dapat diasumsikan bahwa sebagian besar isolat *B. thuringiensis* diperoleh dari dataran tinggi (Kabupaten Sidrap, Sukabumi, Bogor). Tidak ditemukannya isolat dari Kabupaten Cirebon, karena Kabupaten Cirebon merupakan dataran rendah dengan curah hujan rendah dan kelembaban tanah rendah, sehingga kemampuan spora untuk bergerminasi menjadi rendah.

Isolasi *B. thuringiensis* dapat dilakukan dengan cara pemanasan untuk menyeleksi bakteri pembentuk spora (HASTOWO *et al.*, 1992; SCHNEPF *et al.*, 1998). Dengan pemanasan, kemungkinan spora masih hidup, namun sel vegetatif akan mati, sehingga diperlukan teknik selektif dengan menggunakan medium LB dapar asetat (TRAVERS *et al.*, 1987). Dengan LB dapar asetat, maka *B. thuringiensis* dapat dipisahkan dari *Bacillus* spp., karena spora *B. thuringiensis* tidak bergerminasi dalam medium yang mengandung natrium asetat konsentrasi tinggi 0,25 M, sedangkan spora *Bacillus* spp. non *B. thuringiensis* tetap dapat bergerminasi. Setelah *B. thuringiensis* ditumbuhkan dalam medium LB dapar asetat, maka dilanjutkan dengan pemanasan (80°C, selama 5 - 10 menit), yang dilanjutkan dengan menumbuhkan dengan LB agar yang diperkaya dengan ekstrak khamir. Koloni bakteri selanjutnya diamati di bawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 1000 kali. Koloni yang berbentuk batang, berspora dan berkristal dinyatakan positif dan diberi nomer isolat. Koleksi sampel tanah yang positif *B. thuringiensis* berjumlah 20 sampel, sedangkan dari 20 sampel tanah tersebut diperoleh 73 isolat.

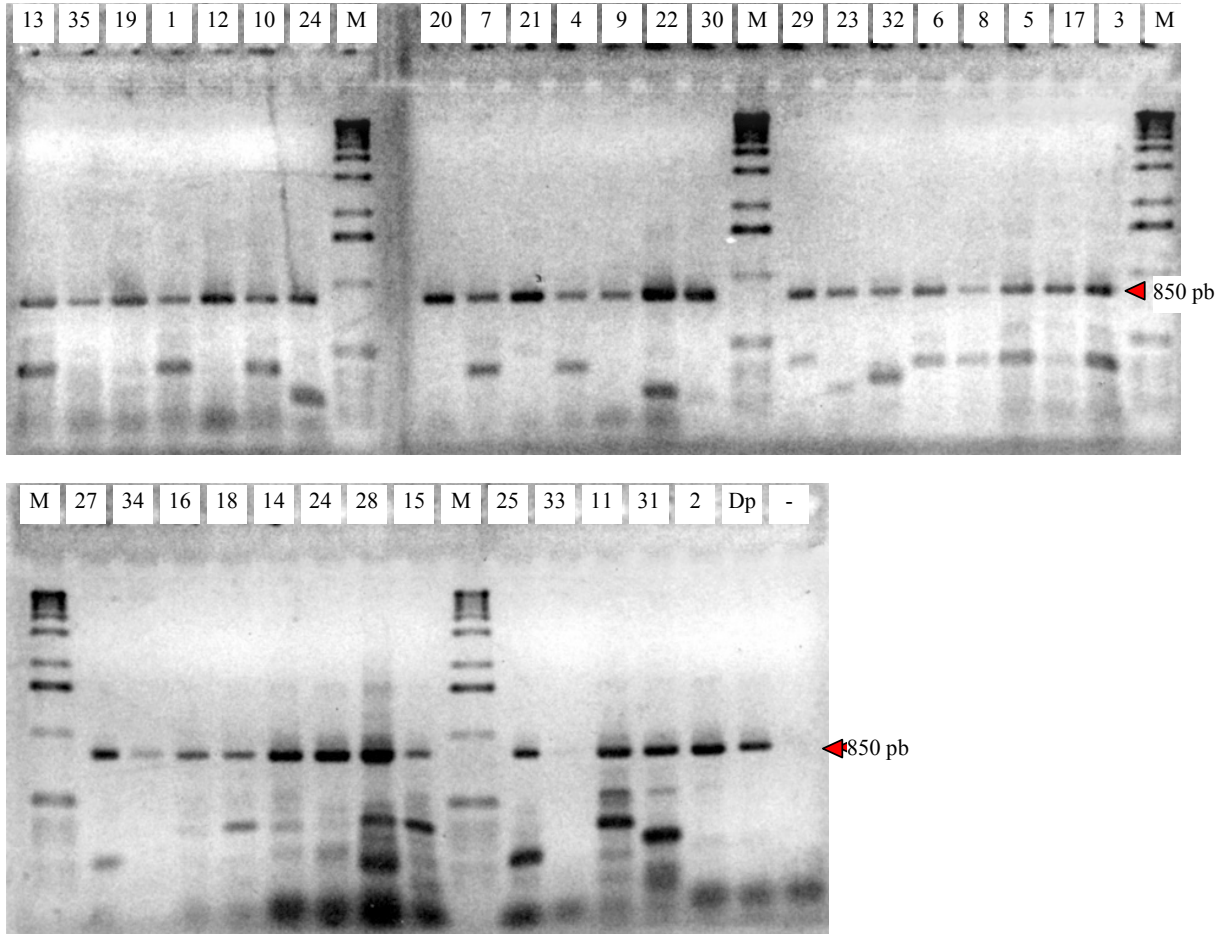
Sebanyak 35 isolat *B. thuringiensis* dari Kabupaten Bogor, Majalengka dan Yogyakarta diisolasi DNAny dan dilakukan uji PCR dengan menggunakan primer *Bt* SpoOA dengan sekuen 5'-AGG GAA TAA ATG AAC GAT AAA C-3' dan 5'-TAA CCG AAT AAG GAC GAA ATA G-3' (Tabel 1). Teknik PCR memiliki

beberapa keuntungan dibandingkan dengan teknik lainnya dalam mengelompokkan dan menentukan kandungan gen *cry* karena deteksi gen *cry* dapat dilakukan dengan menggunakan jumlah cetakan DNA yang sedikit dan dalam waktu yang relatif singkat (CAROZZI *et al.*, 1991). Produk PCR yang dihasilkan dapat dijadikan dasar untuk membedakan kandungan strain *B. thuringiensis* (BOURQUE *et al.*, 1993). Primer *Bt*SpoOA ini akan mengamplifikasi gen sporulasi dari *B. thuringiensis*. Amplifikasi dengan pasangan primer ini akan menghasilkan produk yang berukuran 857 pb. Hampir semua isolat mempunyai produk sebesar 857 pb, kecuali isolat 180.3.2 dari Kabupaten Majalengka yang mempunyai pita samar (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang dihasilkan adalah benar DNA dari *B. thuringiensis* dan dapat digunakan untuk uji selanjutnya. Selanjutnya 35 isolat ini diamplifikasi dengan menggunakan primer *cry*IVA,B dengan sekuen 5'-CAA GCC GCA AAT CTT GTG GA-3' dan 5'-ATG GCT TGT TTC GCT ACA TC-3' (Tabel 1). Primer ini mengamplifikasi gen *B. thuringiensis* subspecies *israelensis* yang spesifik untuk diptera yang berukuran 797 pb (CAROZZI *et al.*, 1991). Subspecies *israelensis* menjadi penting karena terbukti patogen untuk kontrol biologis terhadap beberapa vektor Diptera (DE BARJAC dan SUTHERLAND, 1990). Empat isolat yaitu isolat 31B, 31T, 31R (dari Kabupaten Bogor) dan isolat 177.4.2 (dari Kabupaten Majalengka) menunjukkan produk sebesar 800 pb dalam bentuk pita samar, sedang 12 isolat yang lain menghasilkan pita DNA terang berukuran 400 bp (lihat anak panah Gambar 2).

B. thuringiensis menghasilkan kristal protein yang disebut juga parasporal body. Kristal protein merupakan protoksin yang akan dipecah oleh enzim proteolitik menjadi toksin yang disebut sebagai δ -endotoksin (HEIMPEL, 1967). GOUGH *et al.* (2002) telah mengidentifikasi beberapa isolat *B. thuringiensis* yang toksik terhadap *H.i. irritans* dan *L. cuprina*. Beberapa subspecies *B. thuringiensis* yang telah digunakan secara komersial adalah subspecies *thuringiensis*, *kurstaki*, *dendrolimus*, *galleriae*, *israelensis* dan *aizawai* (TANADA dan KAYA, 1993).

Tabel 2. Isolat yang diperoleh selama penelitian

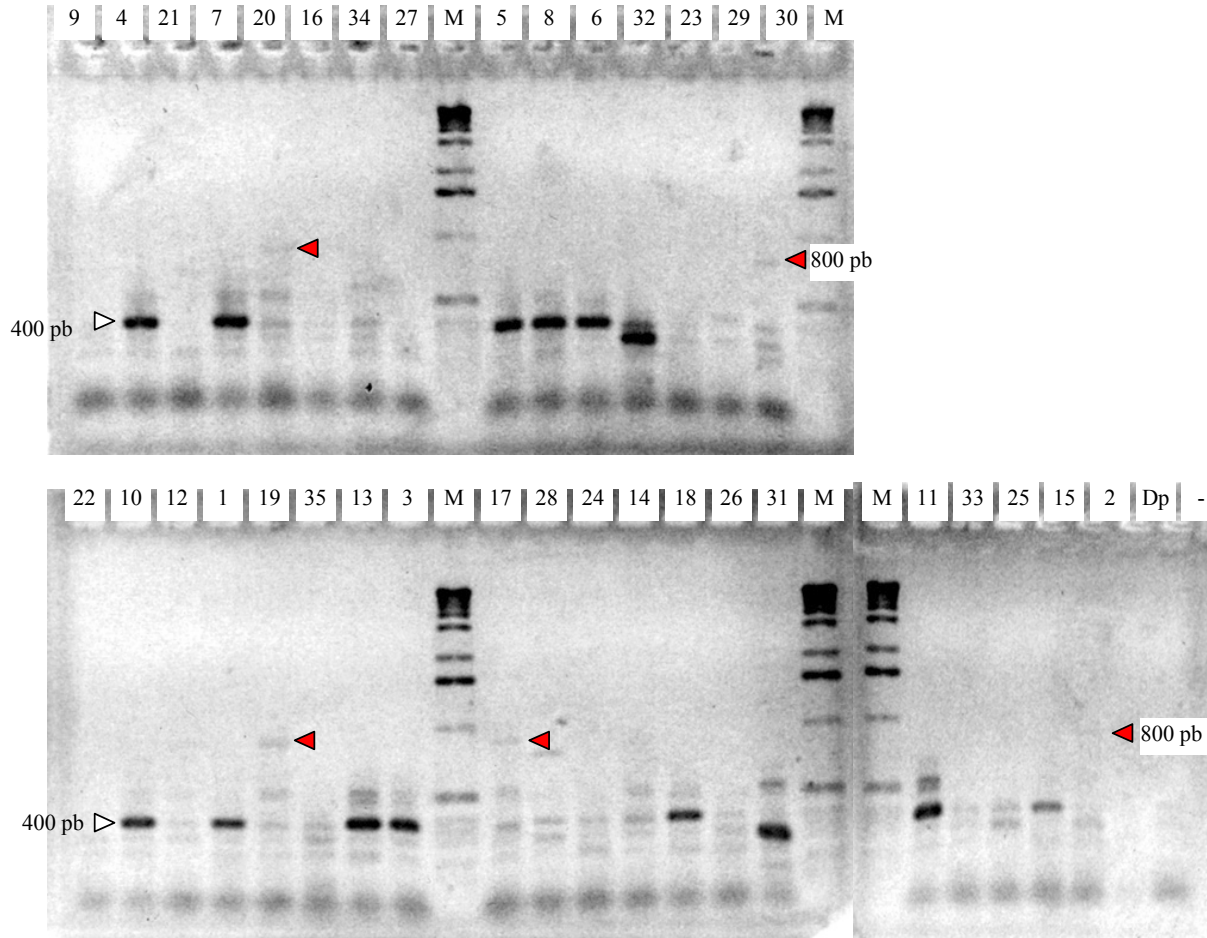
Asal isolat	Jumlah sampel (A)	Jumlah isolat (B)	B/A (x100%)
Kab. Sidrap (Sulsel)	48	7	14,6
Kab. Sukabumi	50	25	50,0
Kab. Bogor	16	21	131,2
Kab. Majalengka	41	13	31,7
Yogyakarta	22	7	31,8
Kab. Cirebon	50	0	0
Jumlah	227	73	32,2



Gambar 1. Amplifikasi isolat *B. thuringiensis* dengan primer *BtSpoOA* yang divisualisasi pada 1,5% gel agarose yang diberi etidium bromida

Pasangan primer *BtSpoOA* akan menghasilkan produk 857 pb (tanda panah). Isolat diberi nomer 1-35, M menunjukkan Marker. Kontrol positif menggunakan Dipel ®(Dp), sedang kontrol negatif menggunakan dH₂O. Nomer isolat adalah sebagai berikut:

- | | | | | |
|--------|---------|-------------|-------------|-------------|
| 1. 31A | 8. 31I | 15. 31P | 22. 103.3.B | 29. 177.4.1 |
| 2. 31B | 9. 31J | 16. 31Q | 23. 104.3 | 30. 177.4.2 |
| 3. 31C | 10. 31K | 17. 31R | 24. 104.3A | 31. 179.4.1 |
| 4. 31D | 11. 31L | 18. 31S | 25. 104.3B | 32. 180.3.1 |
| 5. 31E | 12. 31M | 19. 31T | 26. 104.3C | 33. 180.3.2 |
| 6. 31F | 13. 31N | 20. 31B | 27. 108.3 | 34. 180.3.3 |
| 7. 31H | 14. 31O | 21. 103.3.A | 28. 177.3.2 | 35. 24 |



Gambar 2. Amplifikasi isolat *B. thuringiensis* dengan primer *cryIVA,B* yang divisualisasi pada 1,5% gel agarose yang diberi etidium bromida

Pasangan primer *cryIVA,B* akan menghasilkan produk 797 pb (panah hitam). Beberapa isolat menghasilkan pita DNA berukuran 400 pb (panah putih). Isolat diberi nomer 1-35, M menunjukkan Marker. Kontrol positif menggunakan Dipel®Dp), sedang kontrol negatif menggunakan dH₂O. Nomer isolat adalah sebagai berikut:

- | | | | | |
|--------|---------|-------------|-------------|-------------|
| 1. 31A | 8. 31I | 15. 31P | 22. 103.3.B | 29. 177.4.1 |
| 2. 31B | 9. 31J | 16. 31Q | 23. 104.3 | 30. 177.4.2 |
| 3. 31C | 10. 31K | 17. 31R | 24. 104.3A | 31. 179.4.1 |
| 4. 31D | 11. 31L | 18. 31S | 25. 104.3B | 32. 180.3.1 |
| 5. 31E | 12. 31M | 19. 31T | 26. 104.3C | 33. 180.3.2 |
| 6. 31F | 13. 31N | 20. 31B | 27. 108.3 | 34. 180.3.3 |
| 7. 31H | 14. 31O | 21. 103.3.A | 28. 177.3.2 | 35. 24 |

KESIMPULAN

Sebanyak 35 isolat *B. thuringiensis* dari Kabupaten Bogor, Majalengka dan Yogyakarta telah diisolasi dan dikarakterisasi. Tiga puluh empat isolat mempunyai gen sporulasi *B. thuringiensis* ditandai dengan produk PCR sebesar 797 pb. Empat isolat mempunyai gen *cryIV* yang memproduksi pita berukuran 857 pb, sedangkan 12 isolat memproduksi pita terang berukuran 400 pb. Karakterisasi dengan PCR ini dapat dilanjutkan dengan menggunakan primer spesifik lain yang menyandi gen *cryI*, *cryII* atau *cryIII*. Isolat-isolat lokal *B. thuringiensis* yang sudah dikarakterisasi ini perlu diuji dan digunakan sebagai bioinsektisida terhadap lalat *C. bezziana* maupun terhadap hama peternakan yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- AKHURST, R.J., E.W. LYNES, Q.Y. ZHANG, D.J. COOPER and D.E. PINNOCK. 1997. A 16S rRNA gen oligonucleotide probe for identification of *Bacillus thuringiensis* isolates from Sheep Fleece. *J. Invert. Pathol.* 69: 24 – 31.
- BOURQUE, S.N., J.R. VALERO, R.C. LEVESQUE, J. MERCIER and M.C. LAVOIE. 1993. Multiple Polymerase Chain Reaction for detection and differentiation of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523-527.
- BRAVO, A.S., S. SARABIA, L. LOPEZ, H. ONTIVEROS, C. ABARCA, A. OTRHIZ, L. LINA, F.J. VILLALOBOS, G. PENA, M-E. NUNEZ-VALDES, M. SOBERON and R. QUINTERO. 1998. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- BROTONEGORO, S., SUTRISNO, B. SOEGIARTO, B. LISTANTO dan B SANTOSO. 1997. Perbaikan sifat beberapa isolat *Bacillus thuringiensis* untuk mendukung pemanfaatannya sebagai insektisida mikroba. Laporan Hasil Penelitian APBN. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.
- BUCHANAN, R.R. and N.E. GIBBON. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. The Williams and Wilkins, Co., Baltimore: xxvi, 1268 hlm.
- CAROZZI, N.B., V.C. KRAMER, G.W. WARREN, S. EVOLA and M.G. KOZIEL. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
- CHAK, K.F., D.F. CHAO, M.Y. SENG, S.S. KAO, S.J. TUAN and T.Y. FENG. 1994. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates form Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415-2420.
- CHILCHOTT, C.N., P.J. WIGLEY, A.H. BROADWELL, D.J. PARK and D. J. ELLAR. 1998. Activities of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins *cyt1Aa* and *cyt2Aa* against three species of sheep blow fly. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4060-4061.
- DE BARIJAC, H. and D.J. SUTHERLAND. 1990. *Bacterial Control of Mosquitoes and Black Flies*. Rutgers University Press, New Brunswick.
- GOUGH, J.M., R.J. AKHURST, D.J. ELLAR, D.H. KEMP and G.L. WIJFFELS. 2002. New isolates of *Bacillus thuringiensis* for control of livestock ectoparasites. *Biol. Control* 23: 179-189.
- HASTOWO, S., B.W. LAY and M. OHBA. 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 108-113.
- HEIMPEL, A.M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. In: Annual review of Entomology. SMITH, RF and TE. MITTLER (Eds.). 1967. Annual Reviews, Inc., California: 287-317.
- JOHNSON, C., A.H. BISHOP and C.L. TURNER. 1998. Isolation and activity of strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of the house fly (Diptera: Muscidae) and tropical blow flies (Diptera: Calliphoridae). *J. Invertebr. Pathol.* 71: 138 - 144.
- KRIEG, M.R. and J.G. HOLT. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The William and Wilkins Co., Baltimore xvii, 1581 hlm.
- KRONSTAD, J.W. and H.R. WHITELEY. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene*. 43: 29-40.
- LERECLUS, D., H. AGGAISE, M. GOMINET and J. CHAFAUX. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. *Bio Technology*. 13: 67-71.
- MUCHLIS, A and SUTIJONO. 1973. A short report on the use of asuntol pointment in the treatment of cascado and hoof myasis. *Vet. Med. Rev.* 2: 134-135.
- NORRIS, K.R. and M.D. MURRAY. 1964. Notes on the screwworm fly *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae) as a pest of cattle in Papua New Guinea. CSIRO Division of Entomology *Technical Paper*. 6: 1-26.
- PARTOUTOMO, S. 2000. Epidemiologi dan pengendalian myasis di Indonesia. *Wartazoa*, 10: 20-27.
- PETRAS, S.F. and L.E. CASIDA JR. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1496-1501.
- SCHNEPF, E., N. CRICKMORE, J. VAN RIE, D LERECLUS, J. BAUM, J. FEITELSON, D.R. ZEIGLER and D.H. DEAN. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 63: 775-806.
- SIGIT, S.H. and S. PARTOUTOMO. 1981. Myasis in Indonesia. *Bull. off. Int. Epiz.* 93: 173-178.
- SPRADBERY, J.P. and J. KIRK. 1992. Incidence of old world screwworm fly in the United Arab Emirates. *Vet. Rec.* 130: 33.

- SPRADBERY, J.P. and J.A VANNIASINGHAM. 1980. Incidence of the screwworm fly (*Chrysomya bezziana*), at the Zoo Negara, Malaysia. *Malaysian Vet. J.* 7: 28-32.
- SPRADBERY, J.P., R.S. TOZER and A.A. POUNDS 1985. The efficacy of some acarides against screwworm fly larvae. *Aust. Vet. J.* 60: 57 – 58.
- SUKARSIH, S. PARTOUTOMO, G. WIJFFELS and P. WILLADSEN. 2000. Vaccination trials in sheep against *Chrysomya bezziana* larvae using recombinant peritrophin antigens Cb15, Cb42 and Cb48. *JITV* 5: 192-196.
- SUKARSIH., R.S. TOZER and M.R. KNOX. 1989. Collection and case incidence of the old world screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, in three localities in Indonesia. *Penyakit Hewan* 21 (38): 114 – 117.
- TANADA, Y and H.K. KAYA. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press Inc. United States. 666 hlm.
- TRAVERS, R.S., P.A.W. MARTIN and C.F. REICHELDER. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263-1266.
- WIDYASARI, E. 2001. Deteksi gen *cry 3 Bacillus thuringiensis* Berliner dari Cibinong dan Lampung dengan teknik PCR. Skripsi Sarjana Utama. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok. 78 hlm.