

KLONING GEN CRY DARI BACILLUS THURINGIENSIS VAR. KURSTAKI

CLONING OF THE CRY GENE FROM BACILLUS THURINGIENSIS VAR. KURSTAKI

Nur Rahmi Ardiarni,
Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Sismindari dan Sudjadi
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic organism. The pathogenic effect is caused by crystalline protein, δ -endotoxin, which is encoded by the cry gene. The aim of this study was to clone the cry gene from B. thuringiensis var. kurstaki with a genomic library approach. HindIII digested B.thuringiensis total DNA was ligated to HindIII digested of pUC19, and then used to transform Escherichia coli DH5 α . Selection of transformans carrying recombinant was done by α -complementation and a recombinant clone containing the cry gene was further screened by non-radioactive hybridization method using a probe synthesized from the conserved region of the published cry genes. The result suggested that two recombinant clones with the insert size of 3.4 kb and 2.0 kb, respectively, carrying the cry gene.

Key words: cloning, cry gene, Bacillus thuringiensis

INTISARI

Bacillus thuringiensis merupakan salah satu patogen terhadap serangga hama. Sifat patogen ini disebabkan adanya kristal protein δ -endotoksin yang disandi gen cry. Tujuan penelitian ini adalah mengklon gen cry dari B. thuringiensis var. kurstaki. Kloning dilakukan dengan pendekatan pustaka DNA dengan memotong DNA total menggunakan HindIII yang kemudian diligasikan pada pUC19 yang sebelumnya telah dipotong dengan enzim yang sama. Campuran ligasi digunakan untuk transformasi Escherichia coli DH5 α . Seleksi transforman pembawa plasmid rekombinan dilakukan secara α -komplementasi. Penapisan adanya gen cry dilakukan dengan metode hibridisasi non-radioaktif dengan menggunakan DNA pelacak yang disintesis dari daerah yang mempunyai urutan basa sama dari beberapa gen cry yang telah dipublikasi. Dalam penelitian ini dihasilkan dua klon rekombinan dengan ukuran sisipan berturut-turut 4,3 kb dan 2,0 kb yang diduga kuat membawa gen cry.

Kata kunci : kloning, gen cry, Bacillus thuringiensis.

PENDAHULUAN

Penurunan produksi kapas yang disebabkan oleh serangan serangga hama *Helicoverpa armigera* (Hubner) dapat mencapai 30%-100%. Serangga ini dapat menyerang kapas pada saat baru tumbuh sampai tua (Kartono, 1991). Melihat kenyataan tersebut perlu dilakukan usaha perlindungan terhadap hama untuk mencegah

atau menekan tingkat serangan pada tanaman. Salah satu cara perlindungan yang akrab lingkungan adalah pengendalian secara hayati dengan memanfaatkan berupa patogen serangga, yaitu *Bacillus thuringiensis*.

B. thuringiensis adalah mikro-organisme yang bersifat patogen terhadap *H. armigera* yang termasuk jenis serangga Lepidoptera. Di samping itu, bakteri tersebut dapat bersifat patogen terhadap serangga

jenis Coleoptera dan Diptera (Hofte & Whiteley, 1989). Patogenisitasnya tersebut disebabkan oleh adanya kristal toksin berupa protein yang disebut δ -endotoksin dan disandi oleh gen *cry* (Schnept *et al.*, 1985). Apabila termakan oleh larva, kondisi basa di bagian tengah kerongkongan akan menyebabkan kristal tersebut terdesosiasi dan membentuk protoksin. Protoksin ini di dalam perut akan didigesti oleh protease menjadi toksin aktif (Llewellyn *et al.*, 1992).

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

Penelitian ini merupakan tahap awal untuk memperoleh tanaman tahan hama dengan tujuan untuk melakukan kloning gen *cry* dari *B. thuringiensis* var. *kurstaki* melalui pendekatan pustaka DNA dengan menggunakan vektor pUC19.

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Isolasi DNA total *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Biakan bakteri *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, yang diperoleh dari P3GI Pasuruhan, ditumbuhkan dalam 100 ml medium Luria Bertani cair selama 24 jam dengan goyangan pada suhu 37°C. Sel dipanen dan pelet dicuci dengan EDTA 50mM, kemudian disuspensikan dengan 1,8 ml sukrosa 25% dan 0,2 ml EDTA 50mM. Pada suspensi ditambahkan 100 μ l lisosim (100 μ g/ml) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit, kemudian ditambah 1,2 ml NaCl 5M, 200 μ l EDTA 0,5M, 1,5 ml SDS 20% sedikit demi sedikit sampai

homogen, baru kemudian ditambah 100 μ l proteinase K (10 mg/ml). Suspensi diinkubasi pada 50°C selama 60 menit. Protein dihilangkan dengan diekstraksi dengan fenol : kloroform : isoamilalkohol (25 : 24 : 1) dan kemudian DNA diendapkan dengan etanol 96%. Endapan DNA yang diperoleh dilarutkan dalam bufer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0).

Kloning Gen *cry*. DNA total *B. thuringiensis* var. *kurstaki* dipotong dengan enzim *Hind*III (Boehringer). Hasil pemotongan ini diligasikan dengan pUC19 yang telah dipotong dengan enzim yang sama dan telah dihilangkan kedua ujung fosfatnya dengan fosfatase (CIP). Campuran ligasi ini kemudian digunakan untuk mentransformasi *E. coli* DH5 α sesuai dengan cara yang dijelaskan oleh Sambrook *et al.* (1989). Transforman diseleksi pada medium Luria Bertani yang mengandung ampisilin (100 μ g/ml), IPTG (isopropiltio- β -D-galaktosidase) (25 μ g/ml) dan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolyl- β -D-galaktosid) (25 μ g/ml).

Analisis Klon Rekombinan.

Hibridisasi koloni. Koloni bakteri ditumbuhkan pada membran nitroselulosa kemudian dilisis dengan SDS 10% selama 10 menit, didenaturasi selama 5 menit dan dinetralkan dengan bufer netralisasi (NaCl 1,5M dan Tris-Cl 0,5M pH 8,0). Kemudian membran dikeringkan pada suhu 80°C selama 2 jam. Pelacak DNA, SIS-1 5'-TTCCCTTGTCGCTAACGCAA-3' dan SIS-2 5'-ACCATTAGAAGGACTAGCGC-3' disusun berdasarkan bagian yang mempunyai urutan basa sama pada ujung 5' dan 3' dari beberapa gen *cry* yang telah ada (Wong & Whiteley, 1985). Hibridisasi dilakukan pada suhu 62°C selama 16 jam dengan pelacak berlabel non-radioaktif (digoksinenin-dUTP). Deteksi dilakukan dengan reaksi warna

sesuai dengan protokol (Boechringer), yakni dengan menambahkan antidigoksinogenin-AP (digoksinogenin-alkali fosfatase, kemudian baru ditambahkan pereaksi warna X-fosfat (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat) dan NBT (nitro-biru tetrazolium-klorid) sehingga akan terbentuk warna biru keunguan.

Hibridisasi Southern. DNA plasmid rekombinan dipotong dengan *Hind*III dan dielektroforesis kemudian diblot pada nitroselulosa seperti dijelaskan pada Sambrook *et al.* (1989). Hibridisasi dilakukan pada suhu 62°C menggunakan pelacak seperti pada hibridisasi koloni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kloning Gen *cry*. Pada beberapa gen *cry* yang telah dipublikasi (Starkey *et al.*, 1991; Roy, 1992) tidak terdapat tempat pengenalan *Hind*III, sehingga pendekatan kloning yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pustaka DNA dengan pUC19 sebagai vektor dan enzim *Hind*III. Plasmid pUC19 dipilih sebagai vektor kloning karena akan memudahkan dalam mengetahui adanya plasmid rekombinan. Selain itu plasmid ini merupakan vektor ekspresi sehingga akan mempermudah uji aktivitas toksin. Dalam hal ini pUC19 yang telah dipotong dengan *Hind*III diperlakukan dengan *calf intestinal phosphatase* (CIP) untuk menghilangkan gugus fosfat dari kedua ujung pUC19 supaya tidak terjadi penyambungan kembali kedua ujungnya. Untuk mencari rasio terbaik, ligasi dilakukan dalam berbagai perbandingan antara vektor dan fragmen DNA total.

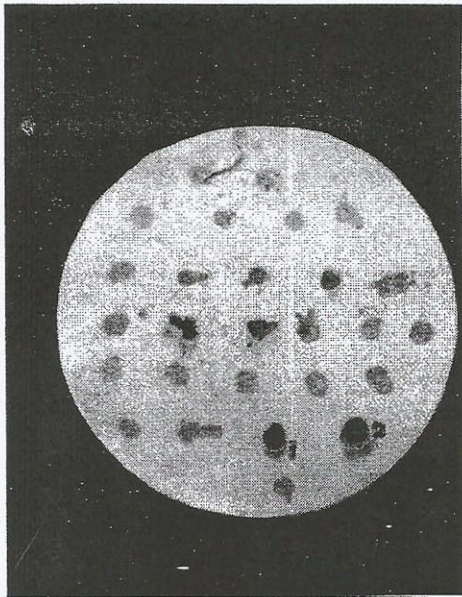
Dari hasil pengamatan terdapat bukti bahwa dengan perbandingan konsentrasi molar vektor dan DNA total (2:1) dapat menghasilkan jumlah koloni rekombinan

terbanyak (31 koloni) walaupun persentase jumlah plasmid rekombinan diperoleh 79% (Tabel 1). Pada rasio DNA *B. thuringiensis* lebih tinggi memang diperoleh persentase rekombinan lebih tinggi, tetapi jumlah koloni rekombinan yang diperoleh lebih rendah. Kenaikan jumlah DNA yang ditransformasi terlihat mengurangi efisiensi transformasi. Selanjutnya pembuatan campuran ligasi untuk memperbanyak koloni rekombinan menggunakan perbandingan 2:1.

Tabel 1. Hasil transformasi dari campuran ligasi berbagai perbandingan molaritas DNA total *Bacillus thuringiensis* dan DNA pUC19

Bt : pUC19	Σ koloni putih	Σ koloni biru	Efisiensi rekombinan
1 : 1	6	7	46
2 : 1	31	9	79
3 : 1	25	6	80
4 : 1	26	4	87
5 : 1	14	3	82

Analisis klon rekombinan. Penapisan untuk mendapatkan gen *cry* di antara koloni rekombinan yang diperoleh dilakukan dengan metode koloni hibridisasi seperti tercantum dalam Bahan dan Metode. Hibridisasi dilakukan menggunakan pelacak DNA yang disintesis berdasarkan susunan primer yang disusun dari daerah homologi pada bagian 5' dari beberapa gen *cry* dengan susunan 5'-TTCCCTTGTCGCTAACGCAA3' (SIS-1). Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa dari 96 koloni rekombinan yang dianalisis, 24 koloni menunjukkan signal positif berupa signal berwarna biru keunguan (Gambar 1) dan di antaranya 10 menunjukkan intensitas warna kuat. Kesepuluh koloni tersebut diisolasi plasmidnya dengan metode lisis alkali. Masing-masing plasmid dipotong dengan *Hind*III untuk memisahkan sisipan dan vektor.

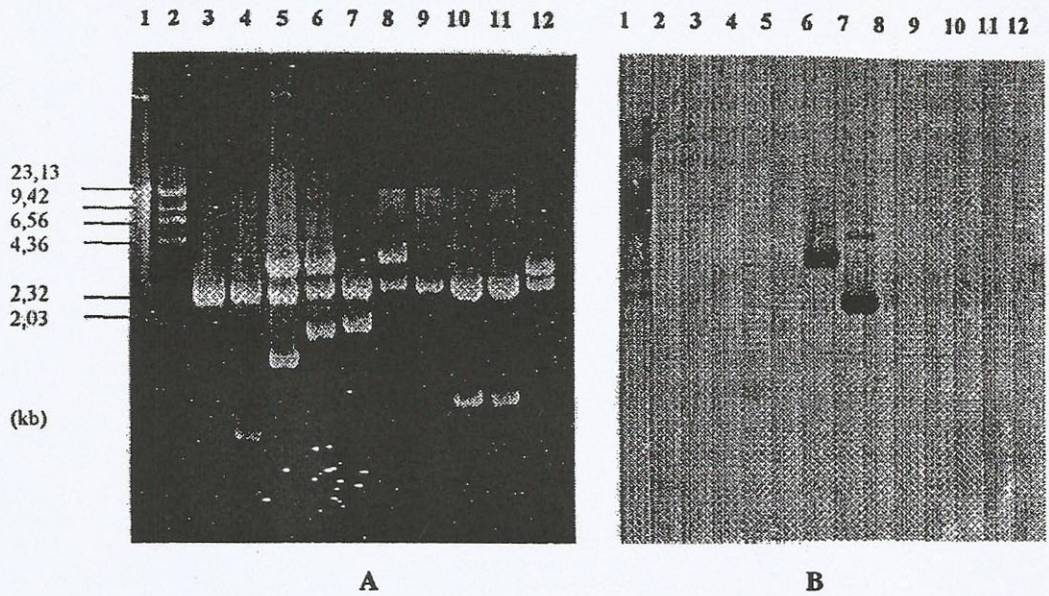


Gambar 1. Hasil koloni hibridisasi menggunakan pelacak SIS1. Dua koloni menunjukkan signal yang sangat kuat.

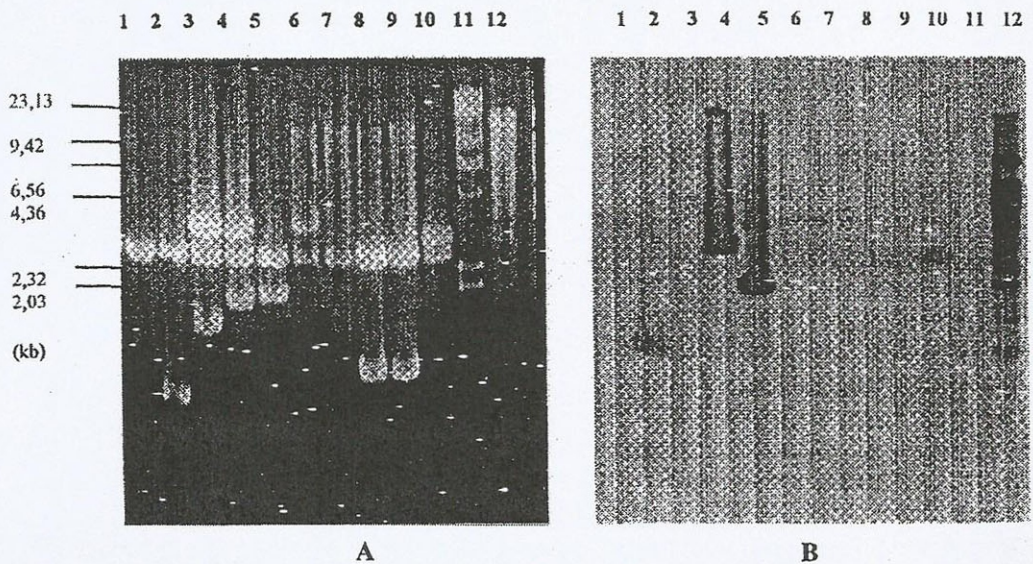
Hasil elektroforesis gel agarosa (Gambar 2A) menunjukkan bahwa 10 koloni tersebut membawa sisipan dengan ukuran antara 0,5 sampai 4,4 kb, sedangkan pita berukuran 2,7 kb adalah vektor pUC19. Pada lajur 5 sisipan berukuran 3,4 dan 1,5 kb, sedangkan pada lajur 6 sisipan berukuran 3,5 dan 2,0 kb. Hal ini disebabkan karena pemotongan DNA total *B. thuringiensis* oleh *Hind*III kurang sempurna sehingga fragmen sisipan masih mempunyai pengenalan *Hind*III. Fragmen DNA tersebut dipindahkan pada membran nilon untuk proses hibridisasi Southern. Hasil hibridisasi dengan stringensi tinggi (62°C) klon pada gambar 2B lajur 6

dan 7 memberikan signal sangat kuat. Adanya signal kuat tersebut karena terjadi komplementasi antara DNA pelacak dan fragmen DNA sisipan. Kedua klon berturut-turut diberi nama pUD14 dan pUD19. Fragmen 3,4 kb pada pUD14 dan fragmen 2,0 kb pada pUD19 diduga membawa gen *cry*. Untuk melihat apakah kedua klon membawa gen *cry* utuh maka dilakukan hibridisasi Southern dengan menggunakan pelacak yang disintesis berdasarkan daerah homolog pada ujung 3' dari bebera gen *cry* dengan urutan basa 5'-ACCATTAGAAGGACTAGCGC-3' (SIS-2).

Hasil hibridisasi menunjukkan bahwa signal positif terjadi pada fragmen 2,0 kb dari pUD19 (Gambar 3B, lajur 4) dan fragmen 3,4 kb dari pUD14 (Gambar 3B lajur 5). Pola tersebut sama dengan hasil hibridisasi dengan menggunakan pelacak basa homolog dari ujung 5' gen *cry* (SIS-1) (Gambar 2B). Dari hasil tersebut maka sangat diharapkan pUD14 dan pUD19 membawa gen *cry* utuh. Akan tetapi untuk membuktikan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melihat ekspresi gen *cry* dan uji aktivitasnya. Jika pada percobaan ekspresi gen *cry* ternyata tidak terekspresi, hal ini mungkin disebabkan arah transkripsi gen *cry* berlawanan dengan arah transkripsi promoter *lac* maka fragmen sisipan perlu diubah orientasinya. Keberhasilan dalam mendapatkan DNA klon rekombinan tersebut memberikan peluang untuk pengembangan tanaman kapas transgenik tahan hama di Indonesia.



Gambar 2. A. Analisis klon rekombinan yang dipotong dengan *Hind*III. Dari kiri kekanan Lajur 1 DNA *B. thuringiensis* dipotong dengan *Hind*III; 2 Lambda dipotong *Hind*III; 3-12 plasmid rekombinan dipotong dengan *Hind*III.
B. Analisis hibridisasi Southern dengan pelacak SIS1. Lajur 6 dan 7 (pUD14 dan pUD19) menunjukkan signal kuat pada fragmen sisipan 3,4 kb dan 2,0 kb.



Gambar 3. A. Elektrogram plasmid rekombinan dipotong dengan *Hind*III (lajur 1-10); Lajur 11 lambda dipotong dengan *Hind*III; lajur 12 DNA total *Bacillus thuringiensis* dipotong dengan *Hind*III.
B. Analisis hibridisasi Southern dengan pelacak Sis2. Lajur 4 dan 5 (pUD14 dan pUD19) menunjukkan signal kuat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof.Dr.Ir. Siti Rasminah Syamidi, peneliti utama pada Proyek Riset Unggulan Terpadu II dengan surat perjanjian 2089/SP-KD/PPIT/IV/95, yang telah memberi dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Attathom, T., Chongrattanamateekul, W., Chanpaisang, J., & Siriyan, R. 1995. Morphological diversity and toxicity of delta-endotoxin produced by various strain of *Bacillus thuringiensis*, *Bull. Entomo. Research.* 85: 167-173.
- Brown, T.A. 1986. *Gene cloning*. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., England; 234 pp.
- Hofte, H. & Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Kartono, G. 1991. *Peranan Gossipol dalam ketahanan tanaman kapas terhadap Helicoverpa armigera (Hubner) Hardwick (Lepidoptera Noctuidae)*, Disertasi dalam Ilmu Petanian, UGM. Yogyakarta: 160.
- Llewellyn, D.J., Brown, M. Cousins, Y., Hartweck, L., Last, D., Mathews, A., Murray, F. & Thisleon, J. 1992. *The science behind transgenic cotton plant*, Proc. 1992. Australian Cotton Conference: 265-379.
- Roy, P. 1992. Genomic amplification and expression of δ -endotoxin fragment of *Bacillus thuringiensis*, *Biochem. Biophys. Research. Comm.* 182: 641-647.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepf, H.E., Wong, H.C. & Whiteley, H.R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence, *J.Biol. Chem.* 260: 6264-6272.
- Starkey, M.P., Fenning, T., Davey, M.R. & Mulligan, 1991. Design and use of synthetic oligonucleotide probes in the cloning of δ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis*, *Enzyme Microb. Technol.* 13: 661-664.
- Wong, H.C. & Whiteley, H.R. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence, *J.Biol.Chem.*, 260: 6264-6272.