

**SIDIK CEPAT ISOLAT-ISOLAT BAKTERI PATOGENIK
TERHADAP *Spodoptera litura* (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.)
DAN *Plutella xylostella* (L.)**

Jesmandt Situmorang*, Sebastian Margino**, Langkah Sembiring*, dan
Siti Sumarmi**

INTISARI

Situmorang, J., S. Margino, L. Sembiring, dan S. Sumarmi. 1997. Sidik Cepat Isolasi-isolasi Bakteri Patogenik Terhadap *Spodoptera litura* (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.) dan *Plutella xylostella* (L.). *Biologi*, 2(3) : 101-114.

Beberapa isolat yang mempunyai kemampuan membunuh serangga hama sasaran *Spodoptera litura* (Fab.) (BNT 7, KP8, dan KLPR2), *Helicoverpa armigera* (Hub.) (PNG9, G6, dan PNG10) dan *Plutella xylostella* (L.) (KLPR1, SML 7, dan KLPR4) dipilih sebagai isolat yang paling unggul dan selanjutnya diidentifikasi pada aras molekuler dengan menggunakan pelacak DNA Teknar (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) dan Dipel (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*).

Hasil analisis menunjukkan bahwa BNT 7 dan KP8 berkerabat sangat erat dengan *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sedang PNG 9, G6, PNG 10, KLPR 1 dan SLM 7 kekerabatannya sangat erat dengan *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Hal ini didasarkan atas besarnya nilai prosentase homologi DNA-DNA antara pelacak DNA dengan DNA isolat, yang besarnya lebih dari 70 %, dengan perkataan lain, isolat tersebut berhasil diidentifikasi sebagai *B. thuringiensis* var. *israelensis* dan *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Adapun isolat KLPR1 dan KLPR4 tidak dapat diidentifikasi ke dalam dua pelacak di atas karena nilai homologinya sangat rendah.

Kata kunci : sidik cepat, bakteri patogenik; *Spodoptera litura* (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.), *Plutella xylostella* (L.)

ABSTRACT

Situmorang, J., S. Margino, L. Sembiring, and S. Sumarmi. 1997. Finger Printing of Entomopathogenic Bacteria Against *Spodoptera litura* (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Plutella xylostella* (L.). *Biologi*, 2(3) : 101-114.

Several bacterial isolates that kill *Spodoptera litura* (Fab.) (BNT 7, KP8, and KLPR2), *Helicoverpa armigera* (Hub.) (PNG9, G6, and PNG10) and *Plutella xylostella* (L.) (KLPR1,

* Staf Pengajar Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

** Staf Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

SLM7 and KLPR4) were identified on molecular level using Teknar DNA probes (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) and Dipel (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*).

The result showed that isolates BNT 7 and KP8 were closely related to *B. thuringiensis* var. *israelensis*, where as PNG 9, G6, PNG 10, KLPR 1 and SLM 7 were closely related to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. This identification was based on DNA-DNA hybridization analysis in which the percentage of DNA homology value of more than 70 %. However, isolates KLPR1 and KLPR4 could not be classified either into *B. thuringiensis* var. *israelensis* nor *B. thuringiensis* var. *kurstaki* since their DNA-DNA homology value were very low.

Key words : *finger printing, entomopathogenic bacteria, Spodoptera litura* (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.), *Plutella xylostella* (L.)

PENDAHULUAN

Spodoptera litura (Fab.), *Helicoverpa armigera* (Hub.) dan *Plutella xylostella* (L.) termasuk hama utama di Indonesia karena menyerang komoditi penting seperti kapas, tembakau, kol, kedelai, kentang, kacang-kacangan, jagung dan lain-lain. (Satrosiswoyo & Evelleen, 1977).

Untuk pengendalian hama-hama tersebut di atas berbagai cara telah dicoba, terutama dengan menggunakan insektisida dan kadang-kadang mengupayakan penggunaan tanaman tahan hama (kalau ada yang tersedia) dan tanaman perangkap (*trap crops*) (Kalshoven, 1981).

Pemakaian insektisida yang terus menerus secara unilateral akan menimbulkan dampak nega-

tif terhadap lingkungan. Data yang tersedia menunjukkan bahwa telah terjadi kekebalan pada hama, resurgensi, musuh-musuh alami serangga hama terbunuh, hama sekunder berkembang menjadi hama utama, serangga penyerbuk dan serangga berguna lainnya juga terbunuh, dan bahkan pemakaian insektisida juga berbahaya bagi hewan-hewan piaraan dan manusia. Oleh karena itu diperlukan adanya alternatif baru, khususnya bakteri entomopatogenik yang dapat dipakai untuk mengendalikan populasi hama tersebut sampai di bawah ambang ekonomi dan aman bagi lingkungan (Aizawa, 1971; Huffaker, 1980; Burgess, 1981; WHO, 1984)

Pada penelitian terdahulu telah didapatkan 170 isolat bakteri yang patogenik terhadap *S. litura*, 6 isolat yang patogenik terhadap *H. armigera*, 5 isolat yang patogenik terhadap *P. xylostella*. Karakterisasi dan penentuan patogenisitas spesifik telah dilakukan pula terhadap 7 isolat yang 2 diantaranya ternyata membunuh sekaligus *S. litura* dan *P. xylostella* (Situmorang et al., 1993). Setelah karakterisasi dan penentuan untuk patogenitas spesifik perlu lebih jauh dilakukan analisis DNA untuk penentuan karakter, khususnya bagi isolat-isolat yang benar-benar berpotensi tinggi. Analisis ini sangat berguna untuk menyeleksi secara cepat strain-strain yang berpotensi tinggi (Aizawa, 1967). Dalam sistem identifikasi dengan analisis DNA ini akan digunakan DNA pelacak yang dibuat dari klon bakteri yang telah diketahui karakter molekuler taksonominya yaitu digunakan *B. t* var. *kurstaki* dan *B. t* var. *israelensis*. Selanjutnya berdasarkan sifat-sifat homologi dari pasangan-pasangan kromosom isolat-isolat tersebut dibandingkan terhadap pasangan-pasangan kromosom pelacak yang telah dike-

tahui. Selain itu, penggunaan DNA pelacak dapat pula untuk menentukan hubungan kekerabatan antar strain. Pengukuran besarnya derajat homologi di antara gen dapat diukur seberapa jauh dan kuatnya pasangan-pasangan di antara rangkaian polideoksiribonukleotida tunggal (Bradley, 1990).

Atas dasar pertimbangan tersebut di atas maka perlu dilakukan sidik cepat untuk menetapkan sifat patogenisitas spesifik isolat-isolat keseluruhan secara pasti, untuk kemudian dipakai sebagai agensia pengendali hayati terhadap masing-masing jenis hama yang rentan. Pemanfaatan ini sangat menguntungkan bagi pengendalian dan penyelamatan lingkungan hidup dari pencemaran.

BAHAN DAN CARA KERJA

Identifikasi isolat menggunakan teknik pelacak DNA.

Isolasi DNA (DNA-Probe)

Isolasi dan pemurnian genomik DNA dilakukan dengan menggunakan metode dari Sambrook et al. (1989), yaitu kultur

bakteri ditumbuhkan dalam medium L Broth atau Nutrien Broth selama satu malam. Kemudian dari kultur bakteri tersebut diencerkan sampai mencapai OD₆₀₀: 0,001, dan ditumbuhkan kembali sampai pertumbuhannya mencapai OD₆₀₀ : 0,5 dalam *orbital shaker incubator*. Selanjutnya kultur bakteri dipanen dengan menggunakan sentrifus selama 15 menit pada suhu 4°C. Pelet dicuci dengan EDTA (50 mM) dua kali, dengan cara menghisap dan menghembuskan kembali suspensi bakteri dengan pipet. Selanjutnya suspensi bakteri disentrifus lagi dan pelet yang dihasilkan disuspensikan ke dalam 400 µl Sukrosa 25% (w/v), 50 nM EDTA buffer (pH 8) dan 20 µl Lisosim. Suspensi selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 60 menit. Pemecahan sel selanjutnya dilakukan dengan 50 µl 20% SDS dan 12,5 µl proteinase K (10 mg/ml) kemudian diinkubasikan selama satu jam pada temperatur 50°C. Sel-sel bakteri tersebut diekstraksi dengan 500 µl campuran fenol/kloroform/isoamilalkohol (50 : 50 : 0,5), suspensi dikocok sehingga terbentuk emulsi seperti susu. Kemudian disen-

trifus selama 15 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Proses ekstraksi tersebut di atas diulangi dengan menambahkan 500 µl campuran kloroform/isoamilalkohol (24 : 1). Pada proses ekstraksi tersebut akan terbentuk tiga fase, suspensi DNA akan berada di bagian atas. Suspensi DNA tersebut kemudian dipresipitasi dengan penambahan 1ml etanol dingin (-20°C). Kemudian digojok secara perlahan-lahan sehingga terlihat benang-benang DNA. Benang-benang DNA tersebut selanjutnya diambil dengan cara disentrifus selama 1 menit, sehingga terbentuk pelet DNA. Setelah DNA dikering-anginkan, pelet DNA (PH 8) dan ditambahkan 10 µl RNase A (10 mg/ml). Selanjutnya larutan tersebut diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 30 menit. Larutan DNA kemudian diekstraksi sebanyak dua kali dengan 300 µl kloroform/isoamilalkohol (24 : 1). Hasil ekstraksi tersebut kemudian disentrifus selama 10 menit dan selanjutnya dipresipitasikan dengan 10 µl 7,5 M amonium asetat dan 500 µl etanol dingin. Benang-benang yang terbentuk diambil dengan cara disentrifus selama 1

menit sehingga terbentuk pellet DNA yang selanjutnya dilarutkan dalam 200 µl larutan buffer TE. Larutan DNA tersebut telah siap untuk proses lebih lanjut, misalnya pemotongan DNA dengan enzim restriksi tertentu.

Pemotongan DNA dengan Enzim Endonuklease

Pemotongan DNA dengan enzim endonuklease membutuhkan waktu lebih kurang 3 jam dengan menggunakan enzim yang berlebihan, buffer serta temperatur yang dianjurkan. Selanjutnya fragmen-fragmen DNA tersebut dipisahkan dengan gel elektroforesis pada kecepatan 60 volt dan diwarnai dengan Ethinium Bromida.

Ligasi pada DNA

Selanjutnya dari proses pemotongan DNA dengan enzim endonuklease adalah proses ligasi DNA. DNA yang akan diligasi dimurnikan dahulu dengan kloroform/isoamil alkohol dan dipresipitasi dengan etanol dingin (-20°C), kemudian setelah etanol diuapkan dan DNA dikeringkan selama 3 menit, DNA dilarutkan

di dalam air terdeionisasi. Selanjutnya DNA tersebut dicampur dengan vektor (puc 18) dan satu T4 - ligase. Campuran reaksi yang terjadi diinkubasikan pada suhu 15°C selama satu malam.

Penyiapan sel kompeten

Sel bakteri yang digunakan sebagai sel kompeten adalah *E. coli* strain *Xli-blue*. Pertama sel bakteri ditumbuhkan pada medium CC Broth yang terdiri dari 0,5 % Yeast Extract, 2 % Trypton, 0,04 M MgSO₄, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu menit di dalam *shaking incubator*. Proses selanjutnya, 1 ml inokulum bakteri dari kultur bakteri berumur satu malam tersebut diinkubasikan di dalam *shaking incubator* (200 rpm), suhu 37°C, sampai pertumbuhan bakteri mencapai OD₆₀₀ : 0,5 kemudian sel bakteri disentrifus pada kecepatan 2500 rpm selama 15 rpm selama 15 menit dan suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan disuspensikan ke dalam 10 ml Trituratoin buffer yang terdiri dari 1000 mM CaCl₂, 70 mM MgCl dan 40 mM Natrium asetat dingin (-20°C). Selanjutnya suspensi dilarutkan sampai 100 ml dengan larutan

buffer yang selalu diinkubasikan di dalam es selama 45 menit. Kemudian suspensi disentrifus lagi ke dalam 10 ml larutan Trituatoin buffer dingin. Akhirnya sel bakteri dikumpulkan dan ditambah 80% gliserol secara perlahan-lahan dikocok hingga konsentrasi akhir suspensi 15% (v/v). Selanjutnya suspensi dibagi-bagi menjadi beberapa tabung dengan volume 200 µl tiap tabung yang kemudian sebelum disimpan di *flash frozen* dalam nitrogen cair. Sel-sel akhirnya disimpan di dalam freezer pada -70°C.

Transformasi sel bakteri

Langkah pertama dalam proses transformasi ialah sel kompeten bakteri dicairkan kemudian ditambah 3 µl DMSO dan DNA bakteri yang akan ditransformasikan. Sel-sel tersebut diinkubasikan di dalam es selama 30 menit, dan secara tiba-tiba sel-sel bakteri tersebut dipanaskan pada suhu 42°C selama 2 menit. Sel-sel tersebut secara tiba-tiba didinginkan dengan cara memasukkannya ke dalam es selama satu menit. Pada sel-sel tersebut ditambahkan 2 ml LB medium dan dikocok secara

perlahan-lahan atau dimasukkan ke dalam *shaking incubator* pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah itu sel-sel bakteri dikonsentrasikan dengan cara disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama satu menit. Pelet yang didapatkan dilarutkan ke dalam 1 ml LB medium dan ditaburkan ke dalam medium selektif yang terdiri atas 25 µg/ml IPTG dan 30 µg/ml X-gal sebanyak 100 µl inokulum per plate dan diinkubasikan satu malam.

Plasmid minipreps dan pembuatan probe

Klon bakteri hasil transformasi ditumbuhkan di dalam 6 ml LB medium semalam, kemudian dipanen pada temperatur kamar dengan cara disentrifus 11.000 rpm selama 2 menit. Pelet yang dihasilkan disuspensikan di dalam 100 µl larutan I (50 mM glukosa, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8) yang didinginkan). Proses pemecahan sel bakteri selanjutnya yaitu dengan menambahkan 200 µl larutan II yang terdiri dari 0,2 M NaOH, 1% Triton X-100. Sisa-sisa protein kromosom dipresipitasi dengan penambahan 150 µl larutan III (3 M CH₃COONa, pH 4,8) yang

telah didinginkan. Suspensi tersebut kemudian disentrifus pada 11.000 rpm selama 10 menit. Larutan supernatan dipindahkan ke dalam tabung yang baru, selanjutnya DNA dipresipitasikan dengan penambahan 450 µl isopropanol pada temperatur kamar selama 5 menit dan kemudian disentrifus pada 11.000 rpm selama 10 menit. Setelah DNA dikeringanginkan, DNA dilarutkan di dalam 80 µl air awa ion. DNA tersebut telah siap untuk dibuat probe. Fragmen-fragmen DNA yang akan digunakan sebagai probe diidentifikasi dengan gel elektroforesis yang selanjutnya gel yang mengandung DNA tersebut diptong lalu dimurnikan dengan menggunakan *Magic clean up kit* (dari Promega) dengan cara seperti yang dianjurkan di dalam buku acuan dari pabrik kemikalia tersebut. Selanjutnya 10 µl DNA dari klon diencerkan dengan menambahkan 15 µl air yang terdapat di dalam ECL Labeling kit (Amersham) di dalam 1,5 ml tube. Kemudian tutup tabung tersebut ditutup dengan parafin dan selanjutnya dimasukkan ke dalam air mendidih selama 15 menit. Setelah itu tiba-tiba tabung dimasukkan ke dalam es selama 5

menit dan disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 11.000 rpm. Selanjutnya pada larutan ditambahkan 15 ml Labeling reagen dicampur dengan cara pemipetan berkali-kali lalu didiamkan selama 5 menit pada suhu 0°C. Proses selanjutnya 15 µl Glutaraldehyde dimasukkan ke dalam larutan, dicampur dengan vortex selama 2 detik, lalu disentrifuse selama 10 detik. Akhirnya larutan tersebut diinkubasikan pada suhu 37°C selama 10 menit dan DNA tersebut telah siap sebagai probe.

Transfer DNA dengan Souther Blotting

DNA yang akan diblot dielektroforesis pada 1,4 % agarose gel yang telah diwarnai dengan Ethidium Bromide sebelumnya. Setelah disinari dengan transiluminasi ultra violet seperti biasanya, gel disinari lebih lama lagi, yakni selama 3 menit. Secara hati-hati gel dicuci dengan larutan Denaturasi (1,5 M NaOH) selama 20 menit di dalam *sandwich box* dan gel diusahakan selalu bergerak bebas, hal ini diulangi dua kali. Setelah itu gel dinetralisir dengan buffer yang terdiri atas 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 1 mM

EDTA pH 7,5 selama 20 menit sebanyak 2 kali). Selanjutnya DNA di dalam gel ditransfer ke membran Hybond N+ selama 4 jam, dengan cara metode *double squash bolt* (Sambrook, 1989). DNA difiksir ke dalam filter dengan meletakkan gel yang mengandung DNA tersebut ke atas *Quickdraw* kertas penghisap di dalam 0,4 M NaOH selama 2 menit. Filter yang sudah diblot dicuci secara cepat di dalam 0,4 M NaOH selama 2 menit. Filter yang sudah diblot dicuci secara cepat di dalam larutan 5 x NSS untuk menetralkan dan menghilangkan sisa-sisa agarose. Akhirnya filter tersebut dikering-anginkan di atas kertas saring Whatman no. 1 selama beberapa menit.

Hibridisasi DNA

Langkah pertama pada proses Hibridisasi adalah meletakkan filter yang telah mengandung DNA ke dalam botol hibridisasi (Techne hybridizer HB-ID) dengan permukaan filter yang mengandung DNA menghadap ke atas. Kemudian ke dalam botol tersebut ditambahkan 15 µl buffer hibridisasi yaitu larutan yang mengandung 0,5 NaCl 0,5 % (w/v) Blocking agent. Filter di-

hibridisasikan selama 2 jam pada temperatur 42°C. Setelah itu ditambahkan probe DNA, filter dihibridisasi selama satu jam pada temperatur 42°C. Kemudian filter dicuci dengan larutan 1/10 NSS; 0,4 % SDS; 6 M urea suhu yang sama seperti proses hibridisasi selama 20 menit, diulangi lagi dengan larutan 1/10 NSS selama 5 menit, sebanyak dua kali. Setelah itu filter dikeringkan dengan posisi bagian yang mengandung DNA selalu menghadap ke atas, filter tersebut dideteksi dengan penambahan *ECL detection labelling kit* (Amersham, Amersham, UK) yaitu yang terdiri atas larutan deteksi dan larutan deteksi 2 yang dicampur dan ditaburkan di atas paper. Filter di dalam *polyethylene bag* dan ditutup. Lalu diekspose dengan sinar X beberapa menit (biasanya 3 menit). Film yang digunakan untuk pemrosesan ini adalah X-Ray (Fuji film) dan Kode GBX khemikalia dari Sigma.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji hayati penelitian sebelumnya bagi isolat terhadap *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera* dan *Plutella xylostella* ditetapkan 9 isolat yang mempunyai

daya bunuh tinggi selama waktu tertentu, yakni berturut-turut adalah BNT 7, KP8 dan KLPR2; PNG9, PNG10, dan G6; SLM 7, KLPR1, dan KLPR4.

Atas dasar digesti (*digestion*) memakai enzim restriksi Hae III, pelacak Teknar (Teknar probe; lama hibridisasi semalam dan waktu pereaksi 10 menit) diperoleh hasil seperti tertera pada Tabel 1, sedangkan hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 1.

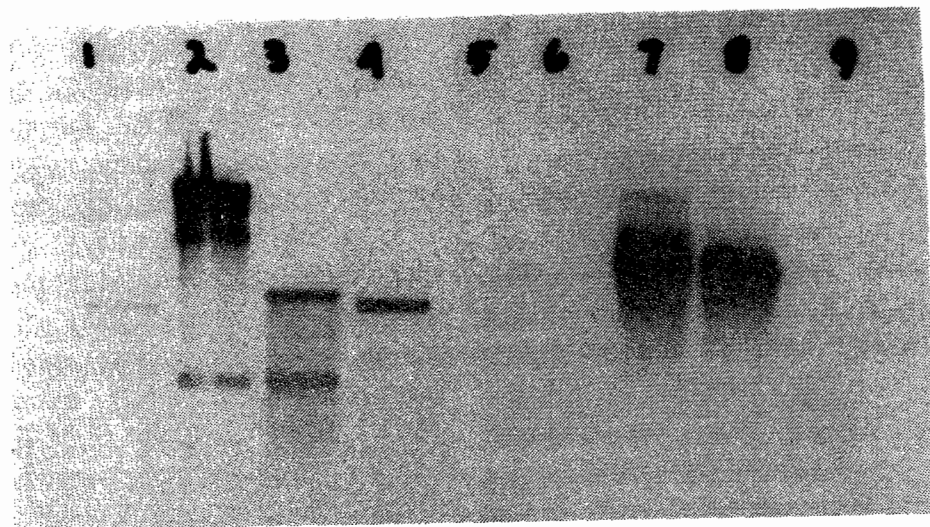
Berdasarkan hasil pada Tabel 1 dan Gambar 1 didapatkan bahwa beberapa isolat yang mampu membunuh serangga *Spodoptera litura* mempunyai kekerabatan (*relatedness*) mendekati *B. thuringiensis* var. *israelensis*, mengingat bahwa pelacak Teknar adalah *B. thuringiensis* var. *israelensis*; KP8 tingkat kekerabatannya jauh lebih dekat dibandingkan KLPR2.

Apabila hasil Tabel 1 dan Gambar 1 dihubungkan dengan Tabel 2 dan Gambar 2, status isolat KP8 dan KLPR 2 menjadi berubah. Hasil analisis memakai enzim restriksi Hae III, pelacak Teknar No. 3 (lamanya waktu hibridisasi semalam dan waktu ekspose 2,5 jam) dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan hasil hibridisasi DNA-DNA disajikan pada Gambar 2. Isolat SLM 7 dan KLPR4 yang mampu membunuh *P. xylostella* mungkin mempunyai gen yang mirip dengan karakter gen yang berasal dari *B. thuringiensis* var. *israelensis* dibandingkan dengan BNT 7. Oleh karena itu dapat disimpulkan sementara bahwa isolat-isolat BNT7, SLM 7, KLPR4 dapat diklasifikasikan sebagai *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

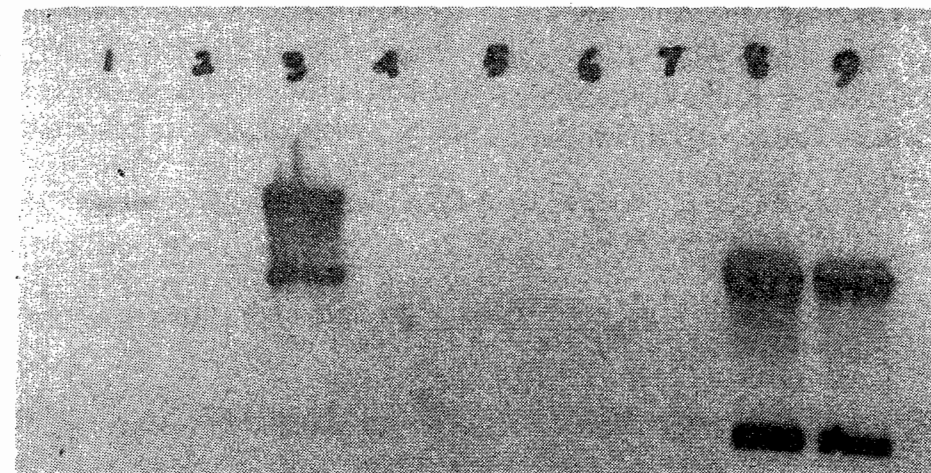
Berdasarkan persentase homologi antara KP8 dengan pelacak Teknar, yang besarnya diatas 70

Tabel 1. Penyebaran hasil hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Teknar no 1 dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik

PITA	ISOLAT								
	BNT 7	KP8	KLPR2	PNG9	G6	PNG10	KLPR1	SLM7	KLPR4
Pita 1	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pita 2	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pita 3	+	-	+	+	-	-	+	+	-
Pita 4	-	+	+	-	-	-	-	-	-



Gambar 1. Hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Teknar No. 1 dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik. Lajur 1 (BNT7), Lajur 2 (KP8), lajur 3 (KP8), lajur 4 (PNG 9), Lajur 5 (G6), lajur 6 (PNG 10) Lajur 7 (KLPR1), lajur 8 (SLM7) lajur 9 (KLPR4).



Gambar 2. Hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Teknar No. 3 dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik. Lajur 1 (BNT7), Lajur 2 (KP8), lajur 3 (KP8), lajur 4 (PNG 9), Lajur 5 (G6), lajur 6 (PNG 10) Lajur 7 (KLPR1), lajur 8 (SLM7) lajur 9 (KLPR4)

%, dapat dipastikan bahwa KP 8 adalah *B. thuringiensis* var. *israelensis* sedang BNT7 dan KLPR2 adalah *B. thuringiensis* lain.

Dalam penelitian ini, selain menggunakan pelacak Teknar juga digunakan pelacak Dipel

(yang mencirikan *B. thuringiensis* var. *kurstaki*).

Hibridisasi DNA-DNA antara isolat-isolat pembunuh ketiga jenis serangga tersebut, dengan pelacak DNA Dipel disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 3. Digesti

DNA memakai enzim restriksi Hind II, pelacak Dipel No. 1, lama hibridisasi semalam dan waktu ekspose 10 menit, hasilnya adalah sebagai berikut:

Identifikasi atas dasar hasil hibridisasi DNA-DNA isolat-isolat bakteri entomopatogenik dengan pelacak No. 1 menunjukkan bahwa isolat PNG9, G6, KLPR 10 dan SLM7 mempunyai tingkat kekerabatan yang dekat dengan *B. thuringiensis* var *kurstaki*.

Hal ini didasarkan pada presentase homologi hibridisasi, nilainya diatas 70%. Perkecualian muncul pada isolat KLPR4 yang tidak masuk ke strain *B. thuringiensis* var *kurstaki*, namun karakter yang terkait dengan *B. thuringiensis* var *kurstaki* juga sangat kecil. Dengan demikian, atas dasar data yang ada, isolat KLPR4 disimpulkan bukan *B. thuringiensis*, melainkan ada kemungkinan *B. cereus* dan *Bacillus* yang lain,

Tabel 2. Penyebaran hasil hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Teknar no 3 dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik.

PITA	ISOLAT								
	BNT7	KP8	KLPR2	PNG9	G6	PNG10	KLPR1	SLM7	KLPR4
Pita 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pita 2	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Pita 3	+	-	-	-	-	-	+	+	=

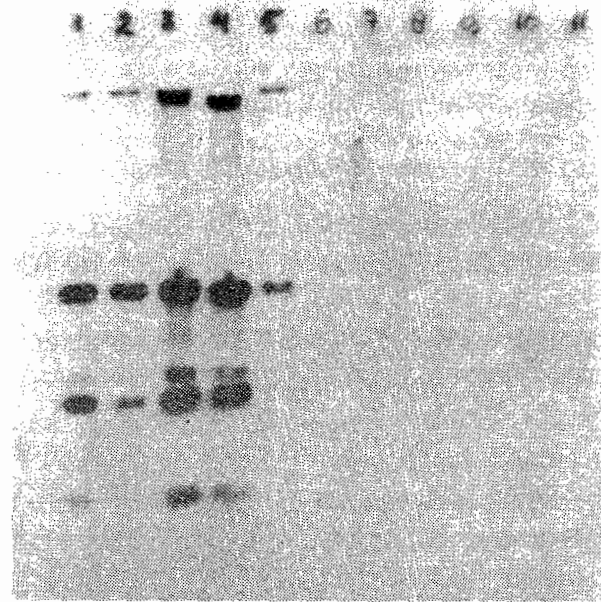
namun mempunyai aktivitas membunuh serangga hama (*Plutella xylostella*).

Isolat-isolat BNT7, KP8 dan KLPR2 tidak menunjukkan adanya keterkaitan dengan *B. thuringiensis*

var *kustaki* dan hanya memiliki beberapa karakter yang sangat erat dengan karakter *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Adapun *E. coli* dan *P. putida* dipakai sebagai kontrol atau pembanding, bahwasanya

Tabel 3. Penyebaran hasil hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Dipel dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik

PITA	ISOLAT											
	PNG9	G6	PNG10	KLPR1	SLM7	KLPR4	KLPR4	BNT7	KP8	KLPR2	E. coli	P. putida
Pita 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pita 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pita 3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pita 4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pita 5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-



Gambar 3. Hibridisasi DNA-DNA antara pelacak Dipel dengan 9 isolat bakteri entomopatogenik. Lajur 1 (PNG9), lajur 2 (G8), lajur 3 (PNG10), lajur 4 (KLPR1), lajur 5 (SLM7), lajur 6 (KLPR4) lajur 7 (BNT7), lajur 8 (KP8) lajur 10 (*E. coli*) dan lajur 11 (*P. putida*)

mereka tidak mempunyai hubungan kekerabatan sama sekali dengan *B.thuringiensis* var. *kustaki*. Hanya ada sedikit kelemahan bahwa kedua isolat tidak dihibridisasi dengan pelacak Teknar No. 1 dan No. 3. Namun demikian informasi ini pun cukup mendukung ada tidaknya hubungan antara bakteri patogenik dengan serangga hama uji.

KESIMPULAN

1. Isolat bakteri entomopatogenik terhadap *Spodoptera litura* (ulat grayak) adalah *B. thuringiensis* var. *israelensis*.
2. Isolat-isolat bakteri entomopatogenik terhadap *Helicoverpa armigera* dan *Plutella xylostella* adalah *B. thuringiensis* var. *kustaki*.
3. Isolat KPLR4 tidak termasuk ke dalam *B. thuringiensis* meskipun mempunyai kemampuan membunuh serangga hama *Plutella xylostella*.

PUSTAKA ACUAN

Aizawa, K. 1971. Strain Improvement and Preservation of Virulence of Pathogens. In: H.D. Burgess and N.W.

Hussey (Eds.) *Microbiol Control of Insect and Mites*. Academic Press, London, pp.: 655-672

Aizawa, K. and Fujiyashi. 1967. Selection & Breeding of Bacteria for Control of Insect Pest in Agricultural Countries. *Proc. U.S.-Japan Seminar on Microbial Control. of Insect Pest*.

Aizawa, K., N. Fujiyashi, M. Ochba and N. Yoshikawa. 1975. Selection and Utilization on *Bacillus thuringiensis* for Microbial Control. *Proc. First International Congress of Insects Pest Control*.

Bradley, S.G. 1990. DNA Reassociation and Base Composition. In: *Microbiological Classification & Identification*. Goodfellow & Broad (Eds.) Academic Press., London

Burgess, H.D. 1981. *Microbial Control of Pests and Diseases*. 1970-1980. Academic Press, New York.

Huffaker, C.B. 1980. *New Technology of Pests Control*. John Wiley and Sons, New York.

Kalshoven, L.G.E. 1981. *Pest of Crops in Indonesia*. Revised and Translated by van der Laan. PT. Ichtisar Baru, Van Hoeve, Jakarta.

- Sambrook, J., E.F. Fritz, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Laboratory Manual, 2 nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratories Press, New York.
- Sastrosiswoyo, S. and K.G. Evelleen. 1977. Biological Control of *Plutella xylostella* on Cabbage in Indonesia by The Introduced Parasite, *Diadyma entrophaga*. *Bull. Penelt Hort* 5 (6): 23-31.
- Situmorang., J., L. Sembiring, S. Sumarmi. 1993. Eksplorasi Entomopatogenik sebagai Agen Pengendali Hayati Serangga Hama, *Plutella*, *Spodoptera*, *Helonthis*. *JMS* 1 (D): 1-10
- Steinhaus, E.A. 1960. Selected Topics in Microbial Ecology II, The Importance of Environmental Factors in The Insect Microbe Ecosystem. *Bacteriol. Rev* : 385-373.
- World Health Organization. 1984. Report of The Seventh Meeting of The Scientific Working Group on The Biological of The Vectors. TDR/BCU/SWG-7/84.3.