

Toksisitas Isolat *Bacillus thuringiensis* yang Mengandung Gen *cry* 1A Terhadap Hama Penggerek Batang Jagung, *Ostrinia furnacalis* Guenee

Bahagiawati¹, Habib Rizjaani¹, Agustina K. Sibuea²

¹Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,

²Balai Besar Karantina Ikan Soekarno-Hatta.

Email: bahagiawati@indo.net.id

ABSTRACT

Cry genes isolated from *Bacillus thuringiensis* produce crystal proteins that exhibit a high insecticidal activity against several plant pests. The objectives of this experiment were to detect the presence of *cry1A* sequences from several local *Bacillus thuringiensis* isolates multiplied by Lep1A-Lep1B and Lep2A-Lep2B primers using PCR technique and to determine their toxicity against *Ostrinia furnacalis*, maize stemborer. From 59 tested isolates, 6 of them gave PCR products, two DNA bands, first was 490 bp, the expected size of Lep1A-Lep1B primers, and second was 986 bp, the expected size of Lep2A-Lep2B primers. These isolates were Jtg 2151, 243, Cib 551, Lam 752, Lam 762 and C 522. All of tested isolates showed potentially high toxicity against maize stemborer.

Key words: *B. thuringiensis*, *cry1A*, *Ostrinia furnacalis*, PCR.

Kata kunci: *B. thuringiensis*, *cry1A*, *Ostrinia furnacalis*, PCR.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam bidang pertanian yang dihadapi para petani jagung di Indonesia adalah serangan serangga hama *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Pyralidae) (Kalshoven 1981). Kerusakan yang diakibatkan hama tersebut sangat bervariasi, yaitu dari kerusakan tanaman dan penurunan kualitas hingga kuantitas panen (Oka & Bahagiawati 1984). Jika diuangkan kerugian yang disebabkan oleh serangan hama di Amerika Serikat mencapai 7,7 milyar dolar Amerika (Bent & Yu 1999). Di Indonesia kerugian yang disebabkan oleh serangan hama wereng padi pada

tahun 1976/1977 mencapai 100 juta dollar Amerika (Oka & Bahagiawati 1983).

Usaha pengendalian serangan hama telah dilakukan dengan berbagai cara, di antaranya dengan menggunakan insektisida kimia. Penggunaan bahan tersebut memberikan dampak negatif terhadap kelestarian alam, yaitu matinya organisme non-target, timbulnya hama resisten, serta penumpukan residu pada hasil panen dan di dalam tanah (Oka & Soehardjan 1997). Oleh karena itu, diperlukan cara lain selain hanya dengan pestisida; cara tersebut antara lain dengan mempergunakan biopestisida. Biopestisida yang paling populer dan digunakan secara komersil sejak tahun 1950-an adalah *Bacillus thuringiensis* (Bahagia-

wati 2002), selanjutnya disebut dengan Bt. Bakteri ini dapat diisolasi dari berbagai bahan, seperti dari tanah, permukaan daun, bubuk biji-bijian, dan berbagai bangkai serangga (Carozzi *et al.* 1991; Smith *et al.* 1991). Bt merupakan bakteri yang menghasilkan protein kristal dalam *inclusion body* saat bersporulasi. Protein kristal yang bersifat insektisida itu disebut δ -endotoksin. Gen pengkode protein kristal tersebut dikenal sebagai gen *cry*, kependekan dari kata *crystal*. Salah satu gen *cry* ialah gen *cry1A* yang mengode protein yang bersifat insektisida terhadap serangga hama Lepidoptera dengan bobot molekul 130-140 kilodalton (kDa) (Hofte & Whiteley 1989).

Meskipun telah banyak ada produk komersial yang sudah dipakai secara luas, dan telah diidentifikasi berbagai jenis protein *Cry*, namun penelitian dalam usaha mengisolasi dan mengidentifikasi strain-strain *B. thuringiensis* masih terus dilakukan, karena sejumlah besar serangga hama belum dapat dikendalikan dengan menggunakan toksin yang telah ada. Selain itu, strain-strain baru juga diperlukan untuk menyediakan alternatif bila muncul resistensi serangga hama terhadap strain Bt tertentu (Bahagiawati, 2001). Beberapa metode mutakhir untuk mendeteksi gen *cry* telah dikembangkan, antara lain analisis *Southern blot*, penggunaan antibodi monoklonal, dan analisis elektroforesis hasil *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan primer spesifik (Carozzi *et al.* 1991; Santoso *et al.* 2000). Analisis PCR dengan primer spesifik merupakan pilihan terbaik karena hasilnya dapat menen-

tukan secara cepat keberadaan sekuens gen *cry*, cukup sensitif, relatif cepat, dan mudah digunakan dalam kegiatan rutin (Carozzi *et al.* 1991).

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi 59 isolat Bt lokal koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian apakah mengandung gen *cry 1A* dan untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat-isolat *B. thuringiensis* yang tersebut terhadap *Ostrinia furnacalis* (Pyralidae).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sejumlah 59 isolat Bt berasal dari koleksi Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor digunakan sebagai bahan dalam penelitian ini. Sebagai kontrol positif dipakai isolat yang mengandung bahan aktif *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-7 berasal dari produk komersial dengan nama dagang Dipel. Sebagai kontrol negatif dipakai akuades. Dua set primer digunakan dalam penelitian ini yaitu Lep1A (5' CCGTGCTGGATTTGTGTTA 3') dan Lep1B (5' AATCCCGTATTGTACC AGCG 3') serta Lep2A (5'CCGAGA AAGTCAAACATGCG) dan Lep 2B (Lep2B (5' TACATGCCCTTTCAG GTTCC) (Carozzi *et al.* 1991).

Deteksi gen *cry 1A*

Deteksi gen *cry1A* dimulai dengan isolasi DNA plasmid dari masing-masing isolat dan dilakukan berdasarkan metode lisis alkali Birnboim dan Doly (Ausubel *et al.* 1992) yang dimodifikasi seperti

tercantum dalam Bahagiawati *et al.* (2002). Setelah itu dilaksanakan analisis dengan PCR seperti tercantum pada Bahagiawati *et al.* (2003).

Uji toksisitas.

Pengujian toksisitas dilaksanakan dengan memakai serangga *O. furnacalis* yang diperbanyak pada makanan buatan. Pembuatan makanan buatan, dan cara memperbanyak serangganya dapat dilihat pada Bahagiawati *et al.* (2003). Uji toksisitas isolat *B. thuringiensis* terhadap larva *O. furnacalis* mengikuti Bahagiawati *et al.* (2003) dengan modifikasi sebagai berikut. Sebanyak 1 ml suspensi *B. thuringiensis* dari masing-masing perlakuan diencerkan dengan 9 ml air suling steril, lalu 1 ml suspensi bakteri yang telah diencerkan tersebut dicampurkan ke dalam 9 ml makanan buatan. Makanan buatan yang telah dicampur suspensi bakteri tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri berukuran 50 mm x 9 mm. Setiap cawan petri berisi 2500 µl makanan buatan yang terbagi lagi menjadi 5 bagian, masing-masing 500 µl. Pembagian menjadi 5 bagian ini hanya untuk memudahkan pengamatan. Setelah makanan buatan tersebut membeku, permukaan makanan dilukai dengan tusuk gigi steril untuk memudahkan larva memakan dan hidup dalam makanan buatan tersebut. Sepuluh ekor larva instar I dimasukkan ke dalam setiap cawan petri, masing-masing bagian makanan diinokulasi 2 ekor larva. Penghitungan persentase kematian larva dilakukan pada hari ke-6 setelah inokulasi berdasarkan Abbot (1925). Selain itu, diamati juga berat dan panjang tubuh

larva yang hidup pada hari yang sama. Setiap cawan mewakili satu ulangan, dan masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan dan data diolah dengan menggunakan program komputer *statistical product and service solutions (SPSS) base 10.0 for windows*. Ada tidaknya perbedaan antara data persentase kematian, berat, dan panjang tubuh larva dari setiap perlakuan diuji dengan uji statistika Kruskal-Wallis. Jika terdapat perbedaan antara rerata perlakuan yang diuji, analisis dilanjutkan dengan uji jarak ganda Duncan untuk membandingkan semua pasangan rata-rata perlakuan. Rerata persentase kematian, berat tubuh dan panjang tubuh larva yang hidup kemudian dianalisis dengan analisis regresi linier.

HASIL

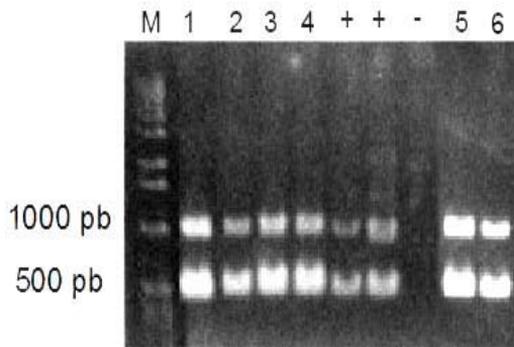
Penyaringan isolat-isolat mengandung gen *cryIA* dengan PCR

Dari 59 isolat *B. thuringiensis* lokal yang disaring, hanya 6 isolat yang memperlihatkan reaksi positif dimana menunjukkan dua pita DNA, yang satu berukuran kira-kira 490 pb yaitu produk dari Lep1A-Lep1B dan yang kedua berukuran 986 pb yang merupakan produk Lep2A-Lep2B (Gambar 1). Pada penelitian ini isolat kontrol positif (Dipel) juga memperlihatkan keberadaan kedua pita DNA tersebut, sedangkan kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya pita DNA.

Uji toksisitas isolat terhadap *O. furnacalis*

Data uji toksisitas terhadap larva *O. furnacalis* pada hari ke-6 setelah infestasi pada seluruh perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil uji Kriskal-Wallis terhadap semua parameter me-

nunjukkan beda antara perlakuan. Analisis data persentase kematian, panjang dan berat tubuh larva yang masih hidup diuji dengan jarak ganda Duncan untuk membandingkan semua pasangan perlakuan dan menunjukkan seluruh isolat memiliki toksisitas yang tidak



Gambar 1. Produk PCR dari beberapa isolat Bt lokal Jtg2151(1), Cib243(2), Cib551(3), Lam752(4), Kontrol positif, dipel (+), kontrol negatif akuades (-), Lam762(5) dan C522(6).

Tabel 1. Toksisitas beberapa isolat Bt lokal yang mengandung gen *cry1A* terhadap hama *O. furnacalis*

Kode isolat	Uji Duncan*		
	Rerata kematian (%)	Rerata berat tubuh larva yang hidup (mg)	Rerata panjang tubuh larva yang hidup (mm)
Kontrol negatif (akuades)	0,00 ^a	5,90 ^b (30)	13,49 ^b (30)
Kontrol positif (Dipel)	83,33 ^b	0,133 ^a (5)	2,91 ^a (5)
Jtg 2151	96,30 ^b	0,23 ^a (2)	1,07 ^a (2)
Cib 243	96,67 ^b	0,03 ^a (1)	0,77 ^a (1)
Cib 551	83,33 ^b	0,77 ^a (5)	2,613 ^a (5)
Lam 752	96,67 ^b	0,003 ^a (1)	1,03 ^a (1)
Lam 762	96,67 ^b	0,20 ^a (1)	0,94 ^a (1)
C 522	86,67 ^b	0,04 ^a (4)	0,78 ^a (4)

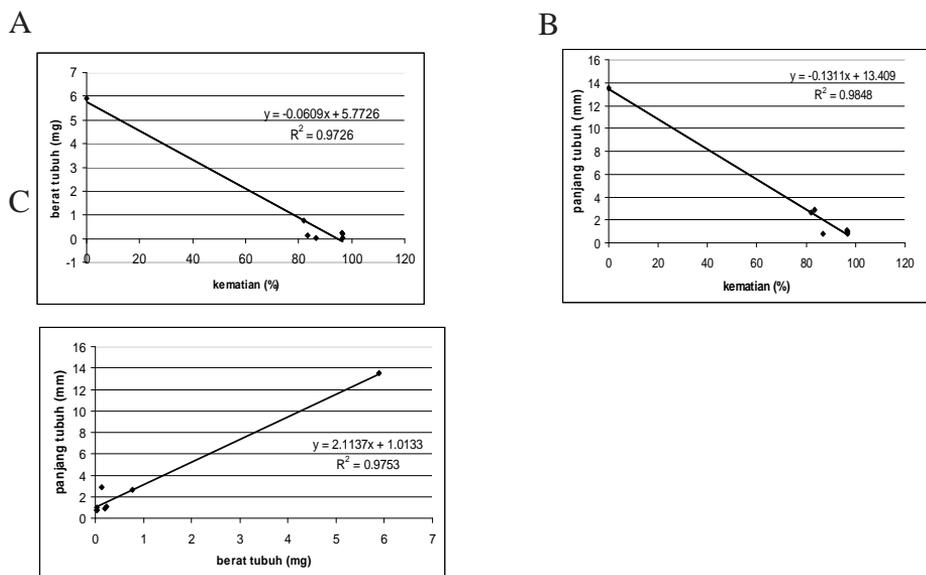
Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam setiap kolom tidak berbeda nyata dengan uji jarak ganda Duncan pada taraf kepercayaan $\alpha = 0,05$, Angka dalam kurung adalah jumlah total serangga yang hidup per perlakuan

berbeda nyata dengan kontrol positif Dipel, namun berbeda nyata dengan kontrol negatif akuades.

Pada pegujian toksitas ini tidak seekorpun dari larva instar I mati pada perlakuan kontrol negatif, yaitu makanan buatan yang tidak mengandung suspensi Bt. Keseluruh larva yang diinokulasikan yaitu berjumlah 30 larva tetap hidup pada waktu dilakukan pengamatan. Berat tubuh larva-larva tersebut mencapai rata-rata 5,9 mg dan panjang tubuh 13,5 mm. Di samping itu juga terlihat aktivitas makan dari larva-larva itu dimana ditandai dengan banyak terdapat kotoran serangga disekitar makanan. Oleh sebab itu larva-larva tersebut mempunyai bobot badan dan panjang tubuh yang sangat berat dan panjang dibandingkan dengan larva-larva yang tetap bertahan hidup pada makanan buatan yang mengandung Bt.

Pada kontrol positif (Dipel), kematian serangga mencapai 83,3%, dari 30 larva yang diinokulasikan hanya 5 larva yang dapat bertahan hidup pada hari ke-6 setelah inokulasi. Larva-larva yang masih hidup ini terlihat lemah, dengan berat tubuh yang relatif kecil yaitu 0,13 mg dan panjang tubuh hanya 2,9 mm. Larva-larva yang masih hidup pada makanan yang mengandung isolat uji baik berat tubuh dan panjang tubuh tidak berbeda nyata dengan larva pada kontrol positif dimana berkisar antara 0,04-0,7 mg untuk berat tubuh dan 0,7 mm-2,6 mm untuk panjang tubuh.

Analisis regresi linier (Gambar 3) menunjukkan adanya hubungan erat antara persentase kematian dan berat tubuh larva ($R^2 = 0,97$), demikian juga dengan panjang tubuh larva ($R^2 = 0,98$). Kedua analisis di atas menunjukkan hubungan yang terbalik; semakin besar



Gambar 3. Regresi linier antara: A. persentase kematian dan berat tubuh, B. persentase kematian dan panjang tubuh, C. berat tubuh dan panjang tubuh larva

persentase kematian larva maka semakin kecil berat tubuh larva dan panjang tubuh larva yang masih hidup. Lain halnya regresi linier antara berat tubuh dan panjang tubuh larva yang hidup dimana menunjukkan hubungan yang erat ($R^2=0,97$) berbanding lurus, semakin berat tubuh larva maka semakin panjang tubuh larva yang masih hidup pada hari ke-6 setelah inokulasi.

PEMBAHASAN

Seperti yang telah dikemukakan, adanya kekawatiran akan pengaruh negatif tentang pemakaian agrokimia telah meningkatkan perhatian masyarakat kepada bioinsektisida sebagai alternatif teknologi untuk menurunkan populasi hama. Salah satu bioinsektisida yang banyak digunakan adalah bioinsektisida yang berbahan aktif Bt. Produksi bioinsektisida Bt ini telah dimulai sejak tahun 1950-an dan sangat berkembang pada tahun-tahun berikutnya, misalnya pada tahun 1980 investasi industri bioinsektisida ini mencapai \$24 juta US dolar dan menjadi \$107 juta US dolar di tahun 1989. Kenaikan investasi industri Bt ini diperkirakan 11% per tahun, dimana pada tahun 1999 mencapai \$300 juta. Bioinsektisida Bt umumnya dikomersilkan dalam bentuk spora berbentuk tepung. Potensi toksisitasnya berlipat dibandingkan dengan pestisida misalnya 300 kali dibandingkan dengan sintetik pyrethroid (Feitelson *et al.* 1992). Pada awal tahun 1995/1996 mulai berkembang bentuk lain dari insektisida Bt ini, yaitu diproduksi dengan sendirinya oleh jaringan tanaman transgenik. Hal ini

dimungkinkan oleh berkembangnya teknologi rekayasa genetika dimana gen *cry* yang terdapat di dalam bakteri Bt kemudian diintroduksi ke jaringan tanaman sehingga tanaman tersebut dapat memproduksi protein yang bersifat mematikan serangga ini. Perkembangan tanaman transgenik ini juga pesat yaitu dimulai hanya meliputi 1,7 ha pada tahun 1996 yang hanya ditanam di 4 negara berkembang menjadi 125 juta ha yang tersebar di 25 negara pada tahun 2007 (James 2008).

Beberapa penelitian isolasi bakteri Bt dengan memakai teknik PCR telah dilakukan di Indonesia (Listanto *et al* 1997; Santoso *et al.* 2000) namun baru pada tahap penentuan keberadaan gen *cry1A* saja, belum pada tahap bioasai toksisitasnya terhadap hama target. Penelitian yang lebih lengkap yaitu identifikasi gen *cry1A* yang diikuti oleh bioasai mulai dilakukan pada tahun 2003 (Bahagiawati *et al.* 2003) dimana dilakukan bioasai terhadap hama utama jagung yaitu *O. furnacalis*, namun pada penelitian ini identifikasi gen *cry1A* dilakukan hanya memakai sepasang primer yaitu Lep 1A-Lep1B. Pada waktu Santoso *et al.* 2000 melaksanakan penelitian identifikasi gen *cry1A* pada 33 isolat Bt lokal, mereka memakai 2 pasang primer, masing-masing Lep1A-Lep1B dan Lep2A- Lep2B. Proses PCR dari tiap pasang primer ini dilakukan satu per satu pada PCR *running* yang berbeda. Pada penelitian kami sekarang ini PCR dilakukan dengan mempergunakan 2 set primer di atas sekaligus dalam satu kali *running*. Hasil penelitian kami memperlihatkan hasil yang lebih akurat

dimana ditemukan hanya 2 pita DNA spesifik untuk *cry1A*. Pada hasil penelitian Santoso *et al.* (2000) ditemukan banyak pita DNA yang tidak spesifik untuk tiap set primer. Dengan demikian penelitian kami ini lebih memberikan kemajuan dari dahulu karena dapat menghemat waktu dan biaya serta hasilnya lebih akurat karena hanya pita spesifik saja yang didapatkan dari hasil visualisasi hasil PCR dengan gel elektroforesis. Pasangan primer Lep1A-Lep1B dan Lep2A dan Lep2B mengamplifikasi segmen DNA gen *cry1A* pada posisi nukleotida yang berlainan, yaitu Lep1A-Lep1B pada posisi 310-800 dan Lep2A-Lep2B pada posisi 2158-3066. Suatu isolat Bt diduga kuat mengandung gen *cry1A* apabila kedua pasang primer menghasilkan produk PCR sebesar 490 dan 908/986 (Carozzi *et al.* 1991).

Proses isolasi dan identifikasi bakteri Bt masih terus berlanjut sampai kini. Pada penelitian kami didapatkan 6 isolat Bt lokal yang berpotensi membunuh serangga *O. furnacalis*. Toksisitas isolat-isolat tersebut disebabkan oleh keberadaan gen *cry1A* yang mengkode protoksin yang spesifik bagi serangga ordo Lepidoptera (Höfte & Whiteley 1989; Ceron *et al.* 1994). Larva yang memakan toksin Bt, setelah beberapa hari tampak kecil, gerakannya lambat, dan aktifitas makan menurun. Larva yang mati berwarna hitam/gelap dan tubuhnya mudah hancur. Kematian larva terjadi karena adanya aktivitas protein kristal *Cry1A* pada usus bagian tengah larva. Protein kristal yang dimakan larva larut bersifat protoksi dan di dalam usus tengah

serangga berubah menjadi toksin. Kemudian toksin tersebut akan berikatan (binding) dengan reseptor spesifik pada sel-sel epitel usus bagian tengah ini dan membentuk pori-pori pada membran sel yang menyebabkan tekanan osmosis yang tinggi di dalam sel dan selanjutnya menyebabkan sel-sel epitelium lisis/pecah dan pada akhirnya kematian larva (Schnepf *et al.* 1998).

Pada penelitian ini ditemukan 6 isolat Bt lokal yang bersifat toksik terhadap *O. furnacalis*. Empat isolat yaitu Jtg2151, Cib 243, Lam752 dan Lam762 toksitasnya melebihi toksitas Dipel, yaitu bioinsektisida Bt yang telah dikomersilkan. Toksin Bt pada isolat yang diuji ini tidak hanya menyebabkan kematian larva, tetapi juga menurunkan berat tubuh dan panjang tubuh larva yang berhasil tetap hidup. Hal ini jelas menunjukkan bahwa toksin Bt tersebut sangat mengganggu metabolisme serangga sehingga mengakibatkan fisik serangga yang tidak sehat pula dan berakhir dengan kematian.

KESIMPULAN

Dari 59 isolat yang diuji, 6 isolat menunjukkan reaksi positif PCR dengan menghasilkan dua pita DNA yang berukuran masing-masing 490 kb dan 986 kb. Berdasarkan hasil uji toksitas isolat *B. thuringiensis* terhadap larva instar I dapat disimpulkan bahwa semua isolat *B. thuringiensis* yang diuji menunjukkan toksitas yang tinggi terhadap larva instar I *O. furnacalis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbot, WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ Ento.* 18: 265-267.
- Ausubel, FM., R. Brent, RE. Kingston, DD. Moore, JG. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 1992. *Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. Second Ed. New York. John Willey.
- Bahagiawati. 2001. Manajemen resistensi serangga hama pada pertanaman tanaman transgenik Bt. *Buletin Agrobio*: 4 (1): 1-8.
- Bahagiawati & Amirhusin. 2002. Penggunaan *Bacillus thuringiensis* sebagai bio- insektisida. *Bul. Agrobio* 5(1): 21-28
- Bahagiawati, D. Setyawan & Sutrisno. 2002. Metode PCR sederhana untuk menapis isolat *Bacillus thuringiensis* yang membawa gen cry V. *J. Mikro Indo*.7(2): 35-38.
- Bahagiawati, H. Rizjaani, & N. Riani Simanjuntak. 2003. Deteksi gen cry 1A *Bacillus thuringiensis* dengan teknik PCR dan toksisitasnya terhadap *Ostrinia furnacalis* Guenee. *J. Mikro. Indo*. 8(1): 27-30.
- Bent, A F. & IC. Yu, 1999. Applications of Molecular Biology to Plant Disease and Insect Resistance. *Advances in Agronomy* 66:251-298.
- Carozzi, NB., VC. Kramer, GW. Warren, S. Evola & M.G. Koziei. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strain by Polymerase Chain Reaction product profiles. *Appl. Envi. Microbiol.* 57(11): 3057-3061.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina & A. Bravo. 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Envi.. Microbiol.* 60: 353-356.
- Feitelson, JS., J. Payne, & L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and Beyond. *Bio/Technology* 10: 271-275
- Höfte, H. & HR. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Micro. Rev.* 53(2): 242-255.
- James, C. 2008. Global Review of Commercial Transgenic Crops: 2008. *ISAAA Briefs*. No. 39. ISAAA, Ithaca, N.Y.
- Kalshoven, LGE. 1981. *Pest of crops in Indonesia*. Terjemahan dari *De plagen van de cultuurgewassen in Indonesie*, oleh Van der Laan, P.A. PT Ichtar Baru-Van Hove, Jakarta.
- Listanto, E., Sutrisno, S. Brotonegoro, B. Santoso, B. Soegiarto & MS. Sarjono. 1997. Deteksi isolat *Bacillus thuringiensis* Indonesia yang mengandung gen cry1A(a), cry1A(b), cry 1A(c) dengan PCR. *Pros. Sem. Perhim. Biotek. Perta. Indone.* Surabaya 12-14 Maret 1997.
- Oka, IN. & Bahagiawati AH. 1983. Wereng coklat dan pengendaliannya dalam perspektif. Masalah dan

- Hasil penelitian Padi. *Risalah lokakarya penelitian padi*, Cibogo, Bogor, 22-24 Maret 1983.
- Oka IN. & Bahagiawati AH. 1984. Pengendalian terpadu hama padi. *Padi-Buku III*: 653-680.
- Oka, IN. & Soehardjan. 1997. Tantangan entomologi pada abad XXI. *Prosiding seminar nasional Tantangan entomologi pada abad ke XXI*. Perhimpunan Entomologi Indonesia Cabang Bogor.
- Santoso, TJ., E. Listanto, Rodiyah, D. Damayanti & Sutrisno. 2000. Identifikasi isolat *Bacillus thuringiensis* Indonesia yang mengandung gen *cryIA* menggunakan teknik PCR. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 5(2): 53-60.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal crystal proteins. *Mol. Biol. Rev.* 63(3):775-806.
- Smith, RA. & GA. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311-315.

Memasukkan: April 2009

Diterima : September 2009