

DETEKSI KRISTAL PROTEIN PADA ISOLAT *BACILLUS* SP. DENGAN PEWARNAAN COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Detection of Protein Crystals in Bacillus sp. with the Coomassie Brilliant Blue Staining

**Maria Denada Siallagan, Christina Nugroho Ekowati, Sumardi,
Emantis Rosa.**

Email: mariadenadasiallagan@gmail.com

Abstract Bacillus is one of the genera of bacteria that has the potential to be developed in the field of biotechnology. Bacillus is able to produce protein crystals during the stationary phase in its life cycle. This protein crystal is a protoxin that is active will be pathogenic in insects. In this study, protein crystal staining was carried out using coomassie brilliant blue dye on the isolate of Bacillus sp. with isolate code B1, B2, and B3. Before being stained, the three isolates were bred on Nutrient Broth (NB) medium at pH 5, pH 7, and pH 9, then incubated for 72 hours. Based on research results, the three isolates were detected to produce protein crystals. Crystal protein of Bacillus sp. on media with a pH of 5 and pH 7 located at the end of the spore, while the protein crystal of Bacillus sp. isolate on media with a pH of 9 located on the outside of the spores.

Keywords: *Protein crystals, Bacillus, coomassie brilliant blue*

Abstrak Bacillus merupakan salah satu marga bakteri yang memiliki potensi untuk dikembangkan dalam bidang bioteknologi. Bacillus mampu menghasilkan kristal protein selama fase stasioner dalam siklus hidupnya. Kristal protein ini merupakan protoksin yang dalam keadaan aktif akan bersifat patogenik pada serangga. Pada penelitian ini, dilakukan pewarnaan kristal protein menggunakan pewarna coomassie brilliant blue pada isolat Bacillus sp. dengan kode isolat B1, B2, dan B3. Ketiga isolat tersebut dibiakkan pada media Nutrient Broth (NB) dengan pH 5, pH 7, dan pH 9, selama 72 jam. Hasil penelitian menunjukkan ketiga isolat tersebut terdeteksi menghasilkan kristal protein. Kristal protein isolat Bacillus sp. pada media dengan pH 5 dan pH 7 terletak di bagian ujung spora, sementara kristal protein isolat Bacillus sp. pada media dengan pH 9 terletak pada bagian luar spora.

Kata Kunci: *Kristal protein, Bacillus, coomassie brilliant blue*

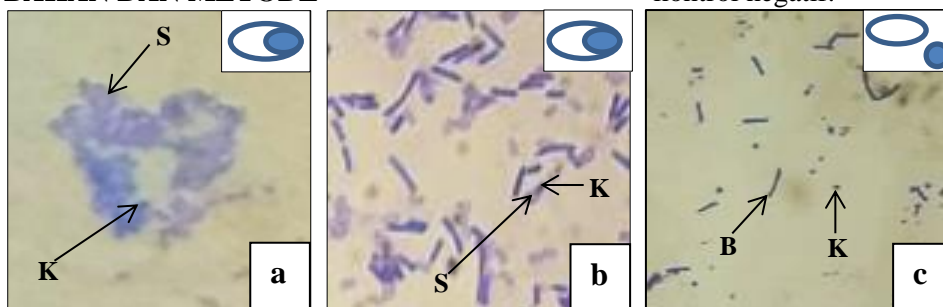
PENDAHULUAN

Bacillus merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang yang memiliki beragam kemampuan fisiologis. *Bacillus* sering digunakan dalam bidang bioteknologi. Hal ini dikarenakan *Bacillus* memiliki kemampuan unik untuk bereplikasi dengan cepat, tahan terhadap kondisi lingkungan yang buruk serta memiliki kemampuan sebagai biokontrol. *Bacillus* mampu menghasilkan endospora. Endospora yang dihasilkan tersebut dapat berbentuk bulat, oval, elips atau silinder. Pembentukan spora ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, oksigen dan suhu lingkungan. Pada pH lingkungan yang cenderung konstan sporulasi tidak akan terpengaruh secara signifikan, namun jika terjadi penurunan atau kenaikan pH secara signifikan maka hal tersebut akan mempengaruhi efisiensi sporulasi.

Pada fase sporulasi, *Bacillus* menghasilkan kristal protein yang merupakan toksin bagi serangga. Berdasarkan penelitian Igen, dkk. mengenai pengaruh pH pada pembentukan kristal protein diketahui bahwa kristal protein terbentuk pada pH 5,5-8,5 namun pH yang efisien dalam proses pembentukan kristal protein *Bacillus thuringiensis* adalah pH 5,5-6,5. Kristal protein ini memiliki kemampuan membunuh serangga secara spesifik pada ordo Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, dan Nematoda. Kristal protein dalam bentuk protoksin akan aktif menjadi toksin pada midgut serangga yang memiliki pH basa.

Keberadaan kristal protein *Bacillus* yang dikultur pada media dengan berbagai pH masih sedikit sekali diteliti. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan deteksi kristal protein *Bacillus* sp. yang dikultur pada pH 5, pH 7, dan pH 9 menggunakan *coomassie brilliant blue*.

BAHAN DAN METODE



Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Peremajaan Isolat *Bacillus* sp.

Isolat *Bacillus* sp. merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Isolat *Bacillus* sp. ini diisolasi dari biji kopi yang ada di kebun kopi Desa Sumber Rejo, Kabupaten Tanggamus, Lampung, yang diberi kode isolat B1, B2, dan B3. Ketiga isolat tersebut diinokulasikan pada media *Nutrient Broth* (NB) pada pH 5, pH 7, dan pH 9 yang kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruang.

Pembuatan Larutan *Coomassie Brilliant Blue*

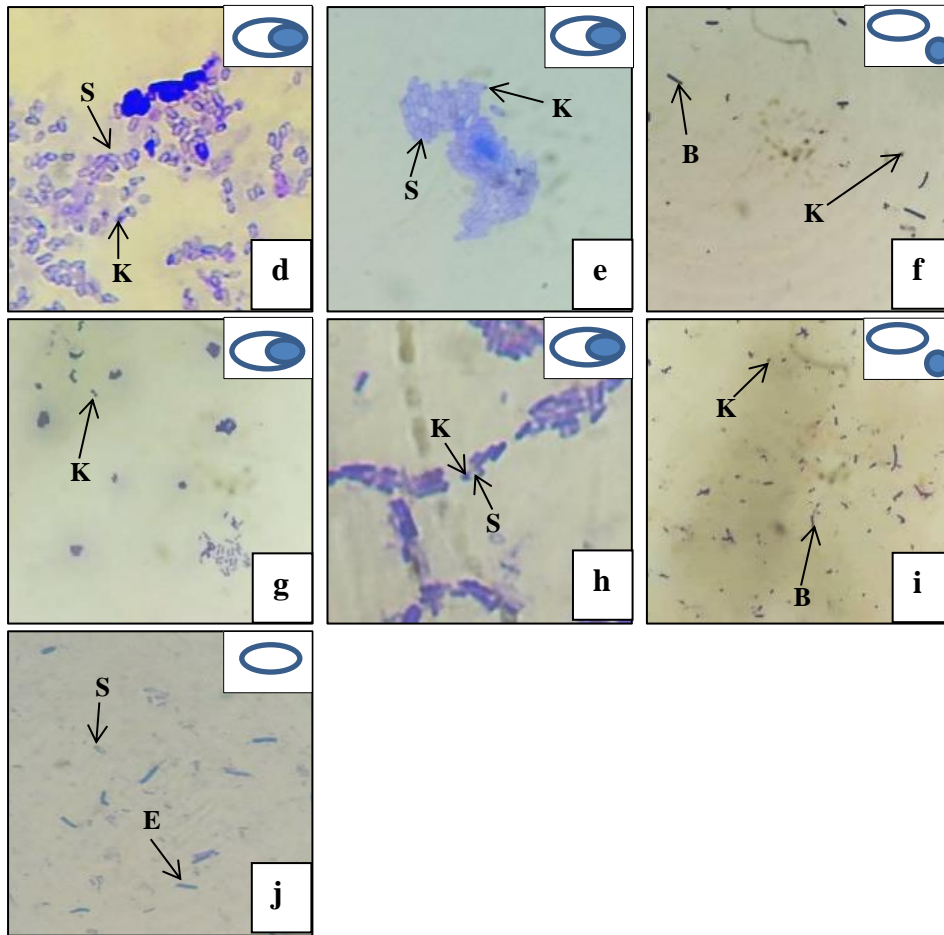
Coomassie 0,1 gram dilarutkan ke dalam 30 mL metanol, kemudian ditambahkan 5 mL asam asetat dan 65 mL aquades. Setelah itu, larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 2 jam kemudian disaring menggunakan kertas Whatman no. 1 dan disimpan di suhu 20°C.

Pewarnaan Kristal Protein

Satu ose *Bacillus* sp. diinokulasikan pada gelas objek yang steril kemudian difiksasi. Setelah itu dibubuhkan pewarna *coomassie brilliant blue* dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian objek dibilas dengan air mengalir lalu dikeringkan dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan kristal protein pada isolat *Bacillus* sp. dengan kode B1, B2, dan B3 yang telah dikultur pada pH 5, pH 7, dan pH 9 ditampilkan pada gambar 1-9 dan pada tabel. Selain itu dilakukan juga pengamatan pada *E. coli* sebagai kontrol negatif.




Gambar 1. Kristal protein dan sel isolat *Bacillus* pada berbagai macam pH media, ilustrasi kristal

- a. Isolat *Bacillus* sp. B1 pH 5
- b. Isolat *Bacillus* sp. B1 pH 7
- c. Isolat *Bacillus* sp. B1 pH 9
- d. Isolat *Bacillus* sp. B1 pH 5
- e. Isolat *Bacillus* sp. B2 pH 7

Keterangan : k adalah kristal protein, s adalah spora, E adalah *E. coli*, B adalah *Bacillus* sp.,

protein dan spora ada di bagian gambar kanan atas.

- f. Isolat *Bacillus* sp. B2 pH 9
- g. Isolat *Bacillus* sp. B3 pH 5
- h. Isolat *Bacillus* sp. B3 pH 7
- i. Isolat *Bacillus* sp. B3 pH 9
- j. Isolat *E. coli*

adalah spora,  adalah kristal protein

Tabel 1. Letak Kristal Protein Isolat *Bacillus* Pada Berbagai Macam pH

No	Isolat	Letak Kristal Protein		
		pH 5	pH 7	pH 9
1.	<i>Bacillus</i> sp. B1	Ujung spora	Ujung spora	Luar spora.
2.	<i>Bacillus</i> sp. B2	Ujung spora	Ujung spora	Luar spora
3.	<i>Bacillus</i> sp. B3	Ujung spora	Ujung spora	Luar spora
4.	<i>E. coli</i>	-	Tidak menghasilkan kristal protein	-

Pada pengamatan di bawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x, diketahui bahwa isolat *Bacillus* sp. dengan kode B1, B2,

dan B3 menghasilkan kristal protein baik di pH 5, pH 7, maupun pH 9. Pada proses pewarnaan, *Coomassie Brilliant Blue* berikatan dengan

protein melalui interaksi ionik antara gugus asam sulfonat dan gugus amino positif. Pada isolat B1, B2 dan B3 yang diinkubasi pada media NB dengan pH 9, kristal protein berada diluar spora. Hal ini dapat disebabkan oleh pH basa yang mendukung autolisis spora dan mengaktifkan toksin kristal protein. Berdasarkan gambar, kristal protein pada isolat B1 memiliki bentuk yang lebih oval dibandingkan dengan isolat B2 dan B3. Hal ini menunjukkan *Bacillus* memiliki jenis kristal protein yang berbeda-beda. Sementara pada isolat *E. coli* tidak terlihat adanya kristal protein. Isolat *Bacillus* sp. dengan kode B1, B2, dan B3 ini memiliki potensi sebagai bioinsektisida karena memiliki kristal protein. Pada penelitian Nair, dkk. dilakukan pengamatan kristal protein *Bacillus thuringiensis* dengan mikroskop *fluorescence*. Bagian kristal protein pada pengamatan tersebut terlihat berwarna hijau dan berpendar, serta bentuknya oval.

KESIMPULAN

Isolat *Bacillus* sp. dengan kode isolat B1, B2, dan B3 mampu menghasilkan kristal protein pada pH 5, pH 7, maupun pH 9 dan dapat dideteksi dengan melakukan pewarnaan menggunakan *coomassie brilliant blue*.

DAFTAR PUSTAKA

- Blakesley, R. W., Boezi, J. A.** 1977. A New Staining Technique for Proteins in Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Chromatog*, **569**, 75-196.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M.** 2005. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV, Amsterdam, pp. 175-206.
- Chengchen Xu, Bi-Cheng Wang, Ziniu YU dan Ming Sun.** 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, **6**, 2732-2270.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., dkk.** 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol*, **71**(9): 4951-4959.

- Hatmanti, Ariani.** 2000. Pengenalan *Bacillus* spp.. *Oseana*, Vol. **XXV**(1), 31-41.
- Icgen, Y., Bulent Icgen, dan Gulay Ozcengiz.** 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* I. Effect of mineral elements and pH. *Elsevier Research in Microbiology* **153**, 599-604.
- Monteiro, M.S., Joao J. Clemente, Adriano O. Henriques, Rui J. Gomes, Manuel J. Carrondo, dan Antobio E. Cunha.** 2005. A Procedure for High-Yield Spore Production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol*, **21** (1026-1031). 775-806.
- Nair, M. S., Marianne M. Lee, Astrid Bonnegarde-Bernard, Julie A. Wallace, Donald H. Dean, Michael C. Ostroeski, Richard W. Burry, Prosper N. Boyaka, Michael K. Chan.** 2015. Cry Protein Crystals: A Novel Platform for Protein Delivery. *Research Article*.