

BULETIN **AgroBio**

ISSN 0853-9022

Vol. 2, No. 1, 1998

JURNAL TINJAUAN ILMIAH RISET BIOLOGI DAN BIOTEKNOLOGI PERTANIAN

Hara N, Efisiensi Penggunaan dan Dinamikanya dalam Sistem Padi Sawah Sismiyati Roechan, Irwan Nasution, & A. Karim Makarim	1
Status Plasma Nutfah Padi di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, 1991-1998 Tiur Sudiaty Silitonga ...	7
Menuju Kesamaan Persepsi Terhadap Taksonomi Bakteri <i>Pseudomonas solanacearum</i> (SMITH 1896) SMITH 1914 M. Machmud	16
Pengembangan Uji Toksisitas Kristal Protein <i>Bacillus thuringiensis</i> dengan Brush Border Membrane Vesicle Tri Puji Priyatno	22
Bioekologi dan Pengendalian Penggerek Polong <i>Etiella</i> spp. Harnoto	31
Hama Wereng Coklat Padi: Perkembangan Biotipe, Mekanisme dan Genetika Ketahanan Varietas Ida Hanarida Somantri	36



Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian

Pengembangan Uji Toksisitas Kristal Protein *Bacillus thuringiensis* dengan Brush Border Membrane Vesicle

Tri Puji Priyatno

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Use of Brush Border Membrane Vesicle (BBMV) for Identification of *Bt* Crystal Protein Toxicity. T.P. Priyatno. Control of insect pest that live inside plant tissues is difficult. Development of transgenic plants carrying *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) genes for production of crystal protein is an alternative for effective control of these pests. The *Bt* genes that encode for production of toxic crystal protein is called the *cry* genes. Prior to transferring the genes to the target plant, they need to be identified and isolated from virulent *Bt* strains. For this purpose it needs an effective, efficient, and accurate technique. Toxicity test of *Bt* crystal protein by insect feeding is not effective for insect that live in plant tissues. A technique using brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from epithelial cell membrane of an insect midgut could be used for this purpose. An active-*Bt* toxin is supposed to bind to a specific receptor located in the luminal plasmal membrane of the insect's midgut columnar epithelial cells. There is a positive correlation between binding affinity or number of binding sites and toxicity to the insect. BBMV that contain specific receptor need to bind the toxin. The BBMV technique could be done *in vitro*, therefore it supposed to be effective, efficient, and accurate. This technique can also be used for detection of insect resistance to *Bt* crystal protein. Development of an effective and efficient diagnostic kit for selection of virulent *Bt* strains and detection of insect resistance to *Bt* crystal protein is therefore necessary.

Key words: Brush border membrane vesicles (BBMV), insect pests, *Bacillus thuringiensis* strains, *Bt* crystal protein toxicity.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) adalah bakteri aerobik gram positif yang mampu bersporulasi dan menghasilkan kristal protein yang toksik terhadap serangga. *Bt* mempunyai empat kelompok strain berdasarkan sebaran inang dan urutan asam amino kristal proteinnya. Kelompok strain I sampai IV masing-masing menghasilkan kristal protein yang toksik terhadap golongan serangga Lepidoptera, Lepidoptera dan Diptera, Coleoptera, dan Diptera (Hofte dan Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992). Pemanfaatan *Bt* untuk pengendalian hama secara biologi bukan merupakan hal baru dalam bidang proteksi tanaman. Pestisida mikroba *Bt* sudah banyak beredar di pasaran. Tanaman transgenik yang membawa gen penyandi kristal protein (gen *cry*) juga sudah

berhasil dikembangkan (Cohen, 1996). Tanaman ini dapat mengekspresikan toksin *Bt* pada jaringannya, sehingga akan efektif untuk mengendalikan serangga hama, termasuk serangga yang stadia larvanya (stadia yang peka) hidup dalam jaringan.

Beberapa jenis serangga yang hidup dalam jaringan merupakan hama penting pada tanaman pangan, seperti *Etiella zinckenella*, *Scirphopaga innotata*, *S. incertillas*, *Cylas formicarius*, *Callosobruchus sinensis*, dan hama ganjur (Kalshoven, 1986). Hama-hama tersebut sangat sulit dikendalikan. Aplikasi insektisida sistemik sebenarnya efektif, tetapi residunya dapat berdampak negatif terhadap jasad bukan sasaran, sedangkan varietas tanaman yang tahan yang dikembangkan melalui teknik pemuliaan konvensional belum banyak diha-

silkan. Oleh karena itu, tanaman transgenik *Bt* merupakan salah satu alternatif yang sedang dikembangkan oleh berbagai lembaga penelitian.

Untuk mengembangkan tanaman transgenik diperlukan gen *cry*. Beberapa gen *cry* telah tersedia, namun demikian dengan pertimbangan perlunya gen *cry* baru dan isu hak kepemilikan, maka pencarian gen *cry* baru perlu terus dilakukan. Langkah awal yang perlu ditempuh adalah kegiatan koleksi dan seleksi isolat-isolat *Bt* yang virulen. Cara yang dapat dilakukan adalah melalui pakan (bioasai), serologi, dan membran usus. Masing-masing cara mempunyai keunggulan dan kelemahan. Bioasai yang benar mempunyai keunggulan bahwa kristal protein secara pasti diketahui keefektifannya. Kelemahannya banyak memerlukan waktu dan tenaga. Uji serologi dan ikatan dengan membran usus mempunyai keunggulan cepat, tetapi mempunyai kelemahan, yaitu (a) mahal dan (b) walaupun suatu isolat menunjukkan reaksi positif pada uji serologi dan ikatan membran usus, tetapi isolat itu belum pasti toksik terhadap hama.

Kristal protein (*s*-endotoksin) adalah suatu protoksin yang akan menjadi toksin aktif bila dicerna oleh protease pada kondisi basa di dalam saluran pencernaan serangga (Hofte dan Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992). Toksisitasnya dimulai dengan terjadinya ikatan antara toksin dengan reseptor spesifik pada luminal membran plasma sel epitel, lalu melakukan integrasi ireversibel dengan membran, dan pembentukan pori atau saluran ion yang bersifat nonspesifik (Hofte dan Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992; Garcznski *et al.*, 1991; Hofman *et al.*, 1988a; Schwarz *et al.*, 1991). Hasil analisis fungsi urutan-urutan asam amino toksin *Bt*

dengan menggunakan teknik *homolog scanning mutagenesis* menunjukkan bahwa toksisitas *cry Bt* ditentukan oleh urutan asam amino dalam domain II yang berfungsi untuk membentuk ikatan dengan membran sel saluran pencernaan. Mutasi pada urutan tersebut dapat menurunkan kemampuan toksin membentuk ikatan dengan membran sehingga toksisitasnya menjadi rendah (Ge *et al.*, 1991; Lu dan Dean, 1994; Rajamohan *et al.*, 1995).

Kemampuan toksin membentuk ikatan dengan membran dapat dideteksi dengan menggunakan *brush border membrane vesicles* (BBMV) yang diisolasi dari saluran pencernaan serangga (Garczynski *et al.*, 1991; Wolfersberger *et al.*, 1986; Hofman *et al.*, 1988a; 1988b; van Rie *et al.*, 1989; 1990a; 1990b). BBMV adalah bagian utama dari *apical brush border* membran sel *columnar* saluran pencernaan. BBMV banyak mengandung reseptor membran spesifik yang dibutuhkan oleh toksin untuk membentuk ikatan dengan membran sel dalam proses toksisitasnya (Wolfersberger *et al.*, 1986; van Rie *et al.*, 1989; 1990a; Ellar, 1990). Adanya ikatan antara toksin dengan BBMV telah dibuktikan dari hasil blotting protein (Garczynski *et al.*, 1991; Hofman *et al.*, 1988a; Ihara *et al.*, 1993; Lu dan Dean, 1994; van Rie *et al.*, 1989; Rajamohan *et al.*, 1995). Toksisitas kristal protein telah diketahui berkorelasi positif dengan kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV (van Rie *et al.*, 1990b; Hofman *et al.*, 1988b; Lu dan Dean, 1994). Hasil penelitian Rajamohan *et al.* (1995) menunjukkan bahwa sekitar 70-80% *cry IAb* yang toksik terhadap *Manduca sexta* membentuk ikatan ireversibel dengan membran *M. sexta*, dibandingkan dengan toksin mutan *cry IAb* nontoksik yang ikatannya hanya 45-50%.

Ihara *et al.* (1993) juga menyatakan bahwa *cry IAa* yang toksik terhadap *Bombyx mori* mempunyai tingkat ikatan ireversibel yang lebih besar dengan reseptor membran daripada *cry IAb* yang kurang toksik.

Oleh karena itu, BBMV dapat digunakan untuk uji toksisitas toksin *Bt*. Penggunaan metode ini merupakan cara alternatif untuk menyeleksi strain-strain *Bt* yang mungkin virulen terhadap serangga hama. Metode ini dapat dilakukan secara *in vitro* dan tidak dipengaruhi oleh perilaku hidup serangga. Di samping itu juga membutuhkan serangga uji yang relatif sedikit, tetapi dapat menyeleksi strain *Bt* dalam jumlah banyak, sehingga menjadi lebih efisien.

Untuk dapat memahami pengembangan metode uji toksisitas *cry Bt* dengan BBMV, dalam makalah ini akan diuraikan tentang mekanisme toksisitas kristal protein *Bt* pada serangga, korelasi antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV, purifikasi BBMV, metode pengujian yang telah dilakukan, dan arah pengembangannya.

MEKANISME TOKSISITAS KRISTAL PROTEIN *BT*

Kristal protein (protoksin) termasuk golongan racun perut pada serangga. Bila termakan, protoksin (70-135 kd) akan dipecah menjadi toksin (60-70 kd) oleh protease pada kondisi basa di dalam saluran pencernaan (Hofte dan Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992; Bielot *et al.*, 1989; Choma *et al.*, 1990; Hofte *et al.*, 1986). Li dan Ellar (1991) telah mempelajari secara mendalam struktur toksin *cry III* dari *B. thuringiensis tenebrionis* menggunakan *X-ray* kristalografi. Toksin *cry III* yang mengandung 644 residu asam amino terbagi atas tiga domain. Domain I yang dimulai dari ujung

atom N sampai residu asam amino ke-290 adalah bundelan tujuh struktur α -helik yang berfungsi dalam pembentukan saluran ion pada membran. Domain II yang dimulai dari residu asam amino ke-291-500 adalah tiga set struktur β -sheet yang masing-masing diakhiri oleh *loop* pada ujung strukturnya. Fungsi domain II adalah untuk membentuk ikatan antara toksin dengan membran. Domain III pada residu asam amino 501-644 merupakan struktur β -*sandwich* yang mempunyai peranan penting bagi berfungsinya saluran ion.

Proses toksisitasnya dimulai dengan terjadinya ikatan antara toksin dengan membran. Proses ini sekurang-kurangnya terjadi dalam dua tahap, tahap pertama adalah terjadinya ikatan antara toksin dengan reseptor spesifik, tahap keduanya dilanjutkan dengan integrasi toksin pada membran (Rajamohan *et al.*, 1995). Menurut Rajamohan *et al.* (1995), ikatan antara toksin dengan reseptor tidak selalu akan berhasil dilanjutkan dengan integrasi ireversibel toksin pada membran karena ikatan toksin-reseptor bersifat reversibel. Oleh karena itu, ikatan toksin-reseptor bukan merupakan faktor utama yang menentukan toksisitas *cry* pada serangga.

Setelah berhasil membentuk ikatan ireversibel, toksin akan melakukan penetrasi membran untuk membentuk pori saluran ion (Hofte dan Whiteley, 1989; Gill *et al.*, 1992; Garczynski *et al.*, 1991; Hofman *et al.*, 1988a; Schwariz *et al.*, 1991). Proses ini dilakukan oleh domain I yang bersifat hidrofobik dan amphipatik pada permukaan struktur bundelan heliknya, sehingga mampu melakukan penetrasi membran sel yang mempunyai dua lapisan lipida (Li *et al.*, 1991). Sebelum penetrasi, bundelan α -helik akan mengalami perubahan struktur utamanya menjadi bentuk

seperti jepitan rambut (*hairpin*) (Li *et al.*, 1991; Convents *et al.*, 1990). Pasangan struktur a-helik yang paling dekat dengan domain II, yaitu a-helik 6-7 akan memulai proses ini, tetapi yang melakukan penetrasi awal adalah struktur a-helik 5 yang menjadi pusat bundelan struktur a-helik (Li *et al.*, 1991). Mekanisme pembentukan pori saluran ion ini mengikuti model pembentukan pori saluran ion oleh *colicin* pada dinding sel *Escherichia coli* (Li *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1989). Pori saluran ion berukuran antara 0,6-1,0 nm, lebih besar dari ukuran kristal ion K^+ , Na^+ , dan NH_4^+ sehingga pori saluran ion ini bersifat nonselektif (Knowles *et al.*, 1991; Stevens, 1991). Adanya saluran ion ini menyebabkan keseimbangan tekanan osmosis sel menjadi berubah, kemudian sel akan membengkak dan akhirnya pecah (Gill *et al.*, 1992; Heimpel dan Angus, 1959).

Heimpel dan Angus (1959) telah membagi tiga tipe serangga berdasarkan tingkat kepekaannya terhadap *cry Bt*. Serangga tipe I sangat peka terhadap *cry Bt*, kematiannya terjadi dalam waktu 1-7 jam akibat sel-sel tubuh dan saluran pencernaannya mengalami *paralisis* yang hebat. Serangga tipe II akan mengalami kematian dalam 2-7 hari. Pada serangga tipe II ini, toksisitas *cry* tidak menyebabkan perubahan pH haemolim serangga, paralisisnya juga hanya terjadi pada saluran pencernaan. Serangga tipe III tidak mati oleh toksin *Bt* tetapi karena *septicemia* setelah spora *Bt* berkecambah.

KORELASI ANTARA TOKSISITAS DENGAN KEMAMPUAN TOKSIN MEMBENTUK IKATAN DENGAN BBMV

Ge *et al.* (1991) telah mempelajari fungsi urutan-urutan asam amino yang berhubungan dengan tok-

sitas dan spesifikasi inang pada toksin *cry IAa* dan *cry IAc* menggunakan teknik *homolog scanning mutagenesis*. Kedua toksin tersebut berbeda toksisitasnya terhadap *Trichoplusia ni* dan *Heliothis virescens*. *Cry IAc* lebih toksik daripada *cry IAa*. Mutasi dilakukan dengan cara menukarkan beberapa fragmen DNA dari kedua gen toksin tersebut. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa urutan asam amino yang menentukan toksisitas dan spesifikasi inang toksin *cry IAc* terhadap *T. ni* dan *H. virescens* masing-masing terletak pada residu 332-450 dan 332-612. Bila urutan tersebut dimutasikan maka toksisitas *cry IAc* akan menurun, tetapi sebaliknya bagi toksin *cry IAa*, bahkan urutan antara 450-612 dari *cry IAc* dapat meningkatkan toksisitas *cry IAa* 30 kali lebih toksik daripada *cry IAa* aslinya terhadap *H. virescens* (Tabel 1). Dari hasil-hasil penelitian selanjutnya diketahui bahwa urutan asam amino tersebut terletak pada domain II dari struktur toksin *cry* yang berfungsi untuk membentuk ikatan toksin pada membran sel saluran pencernaan.

Lu *et al.* (1994) dan Rajamohan *et al.* (1995) masing-masing berhasil mengidentifikasi urutan yang lebih spesifik lagi pada residu asam amino 365-371 toksin *cry IAa* yang toksik terhadap *B. mori* dan residu 370-375 toksin *cry IAb* yang toksik terhadap *M. sexta*. Hasil penelitiannya juga sekaligus dapat membuktikan adanya hubungan antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan pada membran. Deteksi ikatan toksin pada membran dilakukan dengan menggunakan BBMV. Urutan tersebut diduga berada dalam loop ke-2 struktur β -sheet domain II. Penghilangan atau penyisipan asam amino alanin pada urutan antara 365-371 dapat menurunkan toksisitas toksin *cry IAa* pada *B. mori* (Lu *et al.*, 1994). Penurunan toksisitas ini ternyata disebabkan oleh rendahnya kemampuan awal pembentukan ikatan toksin dengan membran. Tetapi pada toksin *cry IAb*, mutasi pada urutan antara 370-375 hanya berpengaruh nyata terhadap pembentukan ikatan ireversibel dengan BBMV, sedangkan pembentukan ikatan awalnya tidak terpengaruh (Rajamohan *et al.*, 1995) (Tabel 2).

Tabel 1. Pengaruh mutasi beberapa urutan asam amino terhadap toksisitas toksin *cry IAa* dan *IAc* pada *T. ni* dan *H. virescens*.

No.	Resipien urutan asam amino yang berubah	Nilai LC ₅₀ (μ g/ml)	
		<i>T. ni</i>	<i>H. virescens</i>
1.	IAa	5,11 + 1,67	2,68 + 0,93
2.	IAa	90-330	>3,00
3.	IAa	332-612	0,33 + 0,09
4.	IAa	332-428	3,16 + 0,66
5.	IAa	450-612	0,01 + 0,003
6.	IAa	332-450	2,20 + 0,97
7.	IAa	428-450	>6,00
8.	IAa	332-526	>6,00
9.	IAc	-	0,30 + 0,22
10.	IAc	90-330	0,29 + 0,17
11.	IAc	332-612	4,21 + 1,68
12.	IAc	332-428	1,05 + 0,41
13.	IAc	450-612	0,28 + 0,06
14.	IAc	332-450	0,37 + 0,15
15.	IAc	428-450	0,78 + 0,21
16.	IAc	332-526	>6,00

Sumber: Ge *et al.*, 1991.

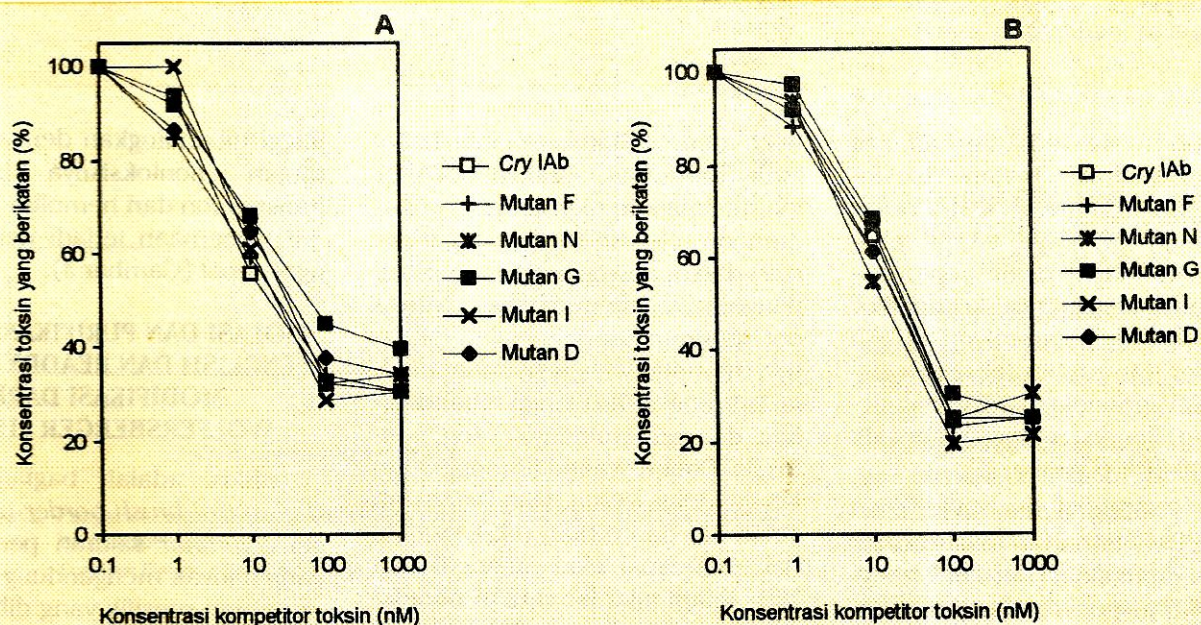
Adanya kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV telah dibuktikan dengan teknik protein blotting. Dari lima jenis BBMV yang telah diuji oleh Garczynski *et al.* (1991), yaitu BBMV tikus, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis zea*, *H. virescens*, dan *M. sexta*, hanya BBMV tikus yang tidak mampu membentuk ikatan dengan toksin cry IAc. Setiap BBMV serangga mengandung senyawa reseptor yang berbeda-beda. Pada BBMV *M. sexta* dan *S. frugiperda*, reseptor yang berikatan dengan toksin cry IAc masing-masing mempunyai berat molekul 120 dan 148 kDa, sedangkan pada BBMV *H. virescens* dan *H. zea* mengandung lebih dari satu jenis senyawa, yaitu 155, 120, 103, 90, dan 63 kDa. BBMV *H. virescens* juga mempunyai senyawa dengan berat molekul 81 kDa. Para ahli menduga bahwa reseptor dalam BBMV serangga adalah berupa glikoprotein (Ellar, 1990; Gill *et al.*,

1992). Reseptor pada BBMV *M. sexta* telah diidentifikasi sebagai aminopeptidase-N (Knowles *et al.*, 1991). Lectin juga dapat menjadi reseptor toksin *Bt* (Muthukumar dan Nickerson, 1987). Afinitas ikatan dan konsentrasi ikatan toksin-BBMV dipengaruhi oleh satu jenis toksin *Bt*, jenis BBMV serangga, dan tingkat toksisitas toksinnya (Tabel 3).

Beberapa peneliti sebelumnya menyatakan bahwa antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan BBMV tidak ada korelasi (Garczynski *et al.*, 1991; Wolfersberger, 1990). Tetapi menurut Rajamohan *et al.* (1995), kesimpulan tersebut dianggap kurang tepat karena tidak memperhatikan sifat ikatan toksin-BBMV. Metode protein blotting dan *competition binding assay* yang digunakan oleh beberapa peneliti sebelumnya hanya mampu mendeteksi ikatan toksin-BBMV yang bersifat reversibel. Pa-

dahal korelasi antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV lebih ditentukan oleh ikatan yang bersifat ireversibel. Ikatan ireversibel ini dideteksi dengan metode *dissociation binding assay*.

Dalam studi *competition binding assay*, baik homolog maupun heterolog, toksin cry IAb dari strain liar dan mutannya yang toksik (mutan N dan mutan I) terhadap *M. sexta* mempunyai kemampuan membentuk ikatan toksin-BBMV yang sama dengan mutannya yang tidak toksik (mutan F, mutan G, dan mutan D) (Rajamohan *et al.*, 1995). Peningkatan konsentrasi kompetitor toksin berpengaruh nyata terhadap penurunan afinitas dan konsentrasi ikatan toksin-BBMV (Gambar 1 A, B). Tetapi pada studi *dissociation binding assay* yang membentuk ikatan ireversibel toksin-BBMV, peningkatan konsentrasi toksin kompetitor kurang ber-



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi kompetitor toksin homolog (A) dan heterolog (B) terhadap kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV menggunakan metode *competition binding assay*.

Sumber: Rajamohan *et al.*, 1995

Tabel 2. Nilai LC₅₀, afinitas ikatan, konsentrasi ikatan, dan I_{sc} inhibition dari toksin cry IAb dan mutannya.

Kode	Perubahan residu asam amino	LC ₅₀ (ng/cm ²)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg)	Slope I _{sc} inhibition (μA/cm ² /min)
Cry IAb	³⁶⁰ RTLSSTLYRRPFNIGINNQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	62 (36-91)	0,61+0,11	2,1+0,29	-22,8+3,3
D2	³⁶⁰ RTLSSTLYRR—NQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	>25.000	0,98+0,13	2,0+0,21	-3,1+1,0
F371A	³⁶⁰ RTLSSTLYRRPANIGINNQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	19x10 ³ - 35x10 ³	1,2+0,11	1,9+0,17	-3,5+0,97
N372A	³⁶⁰ RTLSSTLYRRPFAIGINNQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	125 (100-150)	1,2+0,18	2,1+0,29	-12,8+2,11
G374A	³⁶⁰ RTLSSTLYRRPFNIAINNQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	15x10 ³ - 30x10 ³	1,5+0,12	2,0+0,15	-3,6+1,07
I375A	³⁶⁰ RTLSSTLYRRPFNIGANNQQLSVLDGTEFA ³⁸⁹	150 (90-210)	0,97+0,16	2,0+0,38	-10,1+2,98

Keterangan: Kd = konstanta disosiasi, Bmax = konsentrasi ikatan ¹²⁵I-toksin pada BBMV, I_{sc} = induce short circuit.

Sumber: Rajamohan *et al.*, 1995.

Tabel 3. Afinitas dan konsentrasi ikatan beberapa jenis toksin Bt pada beberapa jenis BBMV serangga.

BBMV	Toksin														
	Cry IAa			Cry IAb			Cry IAc			Cry IB			Cry IC		
	LC ₅₀	Kd	Bmax	LC ₅₀	Kd	Bmax	LC ₅₀	Kd	Bmax	LC ₅₀	Kd	Bmax	LC ₅₀	Kd	Bmax
<i>Manduca sexta</i>	20	1,1	9,9	20	0,2	7,9	9	0,2	6,3	>625	Nonsaturabel binding	111	0,4	8,95	
<i>Helicoverpa virescens</i>	157	0,8	3,7	62	0,61	0,29	7	0,4	2,1	2	0,4	62,3	>2.700	22,4	37,9
<i>Spodoptera littoralis</i>	>1350	Nonbinding											93	0,18	2,04
<i>Lymantria dispar</i>				1,08	19,8	2,7	425	2,03	3,69						
<i>Pieris brassicae</i>	0,9	3,2	13,6	4	46	0,2									
<i>Plodia interpunctella</i>	30	0,72	1,44										110	0,31	0,38
	26300	36,3	1,77										30	0,18	1,15

Keterangan: LC₅₀ dalam ng/cm², Kd dalam nM, Bmax dalam pmol/mg.

Sumber: Ge *et al.*, 1992.

pengaruh nyata terhadap afinitas dan konsentrasi ikatan toksin-BBMV dari toksin cry IA strain liar dan mutan toksiknya, tetapi sebaliknya terhadap mutan nontoksiknya. Pada konsentrasi kompetitor toksin 100 nM, ikatan toksin cry IAb strain liar dan mutan toksiknya pada BBMV mencapai 70-80%, sedangkan ikatan mutan nontoksiknya hanya 40-50% (Gambar 2).

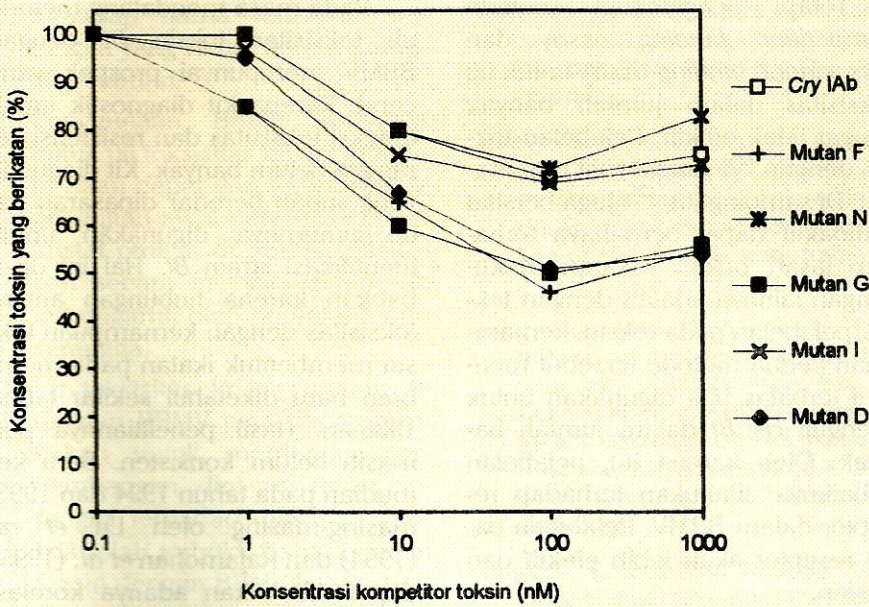
Arti penting ikatan ireversibel toksin-BBMV terhadap toksisitas cry Bt telah dibuktikan dari hasil pengamatan transpor ion dengan *voltage clamping* (Rajamohan *et al.*, 1995). Transpor ion dari haemolim ke saluran pencernaan serangga terjadi karena adanya pembentukan pori saluran ion oleh toksin se-

telah membentuk ikatan ireversibel pada membran. Adanya transpor ion ditunjukkan oleh terjadinya penurunan nilai I_{sc} (*induce short circuit*) dalam *voltage clamping*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa cry IAb strain liar dan mutan toksiknya mempunyai laju penurunan nilai I_{sc} yang sangat tinggi dibandingkan dengan mutannya yang nontoksik. Dalam waktu 30 menit setelah inokulasi toksin, nilai I_{sc} cry IAb strain liar dan mutan toksiknya sudah mencapai nilai antara 0 dan 25%, tetapi nilai I_{sc} mutan nontoksiknya masih di atas 90%. Hal ini menunjukkan bahwa toksin cry IAb strain liar dan mutan toksiknya mempunyai kemampuan membentuk pori saluran ion yang sangat

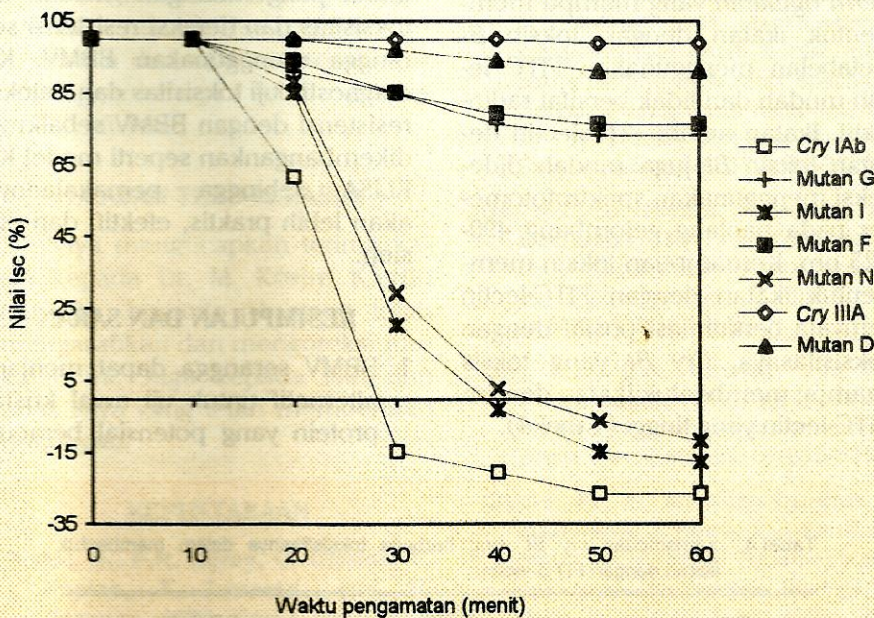
tinggi dibandingkan dengan toksin mutan nontoksiknya sehingga transpor ion dari hemolim ke saluran pencernaan terjadi dengan sangat cepat (Gambar 3).

ISOLASI DAN PURIFIKASI BBMV (ENGLISH DAN READDY (1989) MODIFIKASI DARI WOLFERSBERGER (1987))

BBMV adalah bagian utama dari *apical brush border* membran sel *columnar* saluran pencernaan yang banyak mengandung reseptor membran spesifik yang dibutuhkan oleh toksin untuk membentuk ikatan dengan membran dalam proses toksisitasnya. Dalam mengisolasi saluran pencernaan, larva serangga sebaiknya dinonaktifkan dengan



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi toksin kompetitor terhadap kemampuan toksin membentuk ikatan dengan BBMV menggunakan metode *dissociation binding assay*. Sumber: Rajamohan *et al.*, 1995.



Gambar 3. Pengaruh perbedaan tingkat toksisitas toksin cry IAb dan mutannya terhadap laju transpor ion. Sumber: Rajamohan *et al.*, 1995.

bedah arah memanjang menggunakan gunting. Saluran pencernaannya diambil dan direndam dalam bufer A (50 mM sukrose, 2 mM Tris-Cl, pH 7,4) yang dingin. Kemudian saluran pencernaan dibedah arah memanjang untuk membuang isi dan membran peritropiknya. Saluran pencernaan yang sudah bersih dibekukan dalam freezer agar mudah dilumatkan. Pelumatan dilakukan dalam pelarut bufer A yang dingin yang mengandung 0,1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride. Kemudian ditambah CaCl₂ hingga konsentrasi 10 mM sambil diaduk selama 15 menit. Campuran tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4.300 g selama 10 menit. Endapan yang terbentuk dibuang, sedangkan supernatannya ditambah lagi dengan 0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride dan CaCl₂, lalu disentrifugasi (27.000 g, 10 menit, 5°C). Endapannya disuspensikan dalam 0,32 M sukrose. Suspensi tersebut disaring dengan *gauge needle* nomor 27. Filtratnya merupakan BBMV yang siap untuk digunakan dalam pengujian. BBMV yang belum digunakan sebaiknya disimpan pada suhu -70°C.

ARAH PENGEMBANGAN METODE UJI TOKSISITAS CRY BT DENGAN BBMV

Pemanfaatan tanaman transgenik *Bt*, yang proses pembuatannya membutuhkan biaya sangat mahal, akan dihadapkan pada masalah berkembangnya resistensi serangga terhadap toksin *Bt* (Cohen, 1996). Sampai saat ini telah diketahui lebih dari 15 spesies serangga yang bersifat resisten (Tabashnik, 1994). Resistensi serangga terhadap *cry Bt* dapat berkembang dengan cepat karena adanya mekanisme *cross resistance* (Gould *et al.*, 1992). Serangga yang resisten pada salah satu jenis *cry Bt* sangat

cara mendinginkan dalam es atau menginkubasikan dalam freezer selama 15-30 menit. Isolasi dilakukan melalui pembedahan pungg

gung. Larva direntangkan pada bantalan karet atau parafin. Tengkuluk dan ekornya ditahan dengan tusukan jarum. Punggung larva di-

potensial untuk menjadi resisten terhadap toksin *Bt* lainnya. Resistensi *H. virescens*, *Plutella xylostella*, *Plodia incerpunctella*, dan *Leptinotarsa decemlineata*, masing-masing dapat meningkat sekitar 10.000, 2.800, 140, dan 400 kali dalam waktu 30, 17, 23, dan 35 generasi serangga (Gould *et al.*, 1992; Tabashnik, 1994; McGaughey dan Johnson, 1994).

Untuk mengatasi perkembangan resistensi yang cepat, gen *cry Bt* dalam tanaman transgenik sebaiknya dikombinasikan dengan gen jenis lain yang bersifat kompatibel, misalnya gen inhibitor proteinase (Cohen, 1996). Dalam pola tanamannya, penanaman tanaman transgenik *Bt* perlu dikombinasikan dengan varietas lain atau dengan pergiliran varietas. Tindakan penting lainnya yang harus dilakukan adalah dengan pemantauan sifat resistensi yang intensif, karena deteksi dini sifat resistensi dapat menjadi acuan yang penting untuk melakukan tindakan pengendalian yang cepat dan tepat (Cohen, 1996).

Hasil penelitian van Rie *et al.* (1990b) menunjukkan bahwa resistensi serangga terhadap *cry Bt* ternyata bukan disebabkan oleh adanya perbedaan proses digesti *cry Bt* antara serangga yang peka dan resisten, tetapi oleh adanya penurunan afinitas ikatan toksin pada membran sel saluran pencernaan. *P. incerpunctella* yang resisten terhadap *cry IIA* mengalami penurunan afinitas ikatan toksinnya hingga 50 kali dibandingkan dengan larva yang peka. Hal ini menunjukkan bahwa antara toksisitas dengan perkembangan resistensi mempunyai mekanisme yang sama. Oleh karena itu, pengembangan metode uji toksisitas toksin *Bt* dengan BBMV di samping dapat digunakan untuk program seleksi strain *Bt* yang virulen juga dapat digunakan untuk deteksi dini sifat resistensi.

Tetapi penggunaan metode *competition binding assay* dan *dissociation binding assay* untuk uji toksisitas dalam jumlah banyak sangat tidak efektif. Pelabelan toksin dengan ^{125}I sangat sulit dan mahal. Di samping itu, ^{125}I juga bersifat radioaktif dapat berbahaya terhadap jasad bukan sasaran. Kekurangan lainnya adalah dengan teknik pelabelan pada toksin, kemampuan kedua metode tersebut menjadi terbatas bila digunakan untuk menguji *cry Bt* dalam jumlah banyak. Oleh karena itu, pelabelan sebaiknya dilakukan terhadap reseptor dalam BBMV. Pelabelan pada reseptor akan lebih efektif dan efisien.

Muthukumar dan Nickerson (1987) menggunakan *fluorescens isothiocyanate* (FITC) untuk melabel reseptor jenis *lectin* dari *wheat germ agglutinin* yang mampu membentuk ikatan dengan toksin *Bt*. Pelabelan menggunakan FITC lebih mudah dan tidak bersifat radioaktif. Ikatan antara FITC-lectin dengan toksin *Bt* juga mudah dideteksi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 490-525 nm. Kemampuan toksin membentuk ikatan dengan FITC-lectin ternyata berkorelasi positif dengan toksisitasnya. *Cry Bt* yang toksis mampu membentuk ikatan dengan FITC-lectin yang tinggi (Tabel 4).

Pada masa mendatang metode uji toksisitas toksin *Bt* dengan BBMV mempunyai prospek yang cerah karena kit diagnostik untuk deteksi toksisitas dan resistensi serangga belum banyak. Kit diagnostik yang sudah beredar dipasaran pada umumnya digunakan untuk identifikasi strain *Bt*. Hal ini disebabkan karena hubungan antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan pada membran baru diketahui sekitar tahun 1986-an. Hasil penelitiannya pun masih belum konsisten. Baru kemudian pada tahun 1994 dan 1995, masing-masing oleh Lu *et al.* (1994) dan Rajamohan *et al.* (1995) dapat dibuktikan adanya korelasi antara toksisitas dengan kemampuan toksin membentuk ikatan pada membran. Hasil penelitian tersebut menjadi dasar yang penting untuk pengembangan metode uji toksisitas dan deteksi resistensi serangga menggunakan BBMV. Kit diagnostik uji toksisitas dan deteksi resistensi dengan BBMV sebaiknya dikembangkan seperti model Kit ELISA sehingga pemakaiannya akan lebih praktis, efektif, dan efisien.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. BBMV serangga dapat menjadi alternatif untuk uji awal kristal protein yang potensial beracun

Tabel 4. Kemampuan *cry Bt* yang berbeda toksisitasnya dalam membentuk ikatan dengan FITC-lectin.

Fraksi kristal	LC ₅₀ (ng/ml)		OD ikatan FITC-lectin (WGA)
	4 jam	24 jam	
Kontrol	7,5	3,0	0,59
1	20,0	15,0	0,26
2	32,0	25,0	0,11
3	53,0	35,0	0,12
4	100,0	70,0	0,07
5	225,0	101,0	0,06
6	238,0	138,0	0,04

Keterangan: OD = optikal density, 1 unit OD = 1 mg/ml kristal.

Sumber: Muthukumar dan Nickerson, 1987.

- terhadap hama termasuk serangga yang hidup dalam jaringan tanaman.
- Penggunaan BBMV serangga untuk uji toksisitas kristal protein *Bt* akan cepat dan akurat untuk pengujian awal potensi beracun kristal protein *Bt* karena dilakukan secara *in vitro* dan tidak terpengaruh oleh perilaku hidup serangga.
 - Uji toksisitas kristal protein *Bt* dengan BBMV juga dapat digunakan untuk memantau perkembangan dini resistensi serangga terhadap toksin *Bt* apabila telah terbukti bahwa ikatan toksin dengan BBMV berasosiasi dengan tingkat resistensi hama terhadap kristal protein *Bt*.
 - Pada masa mendatang, metode ini perlu dikembangkan menjadi kit diagnosis untuk program seleksi strain *Bt* yang cepat dan deteksi dini sifat resistensi agar penggunaannya lebih praktis dan efisien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terima kasih kepada Dr. M. Kosim Kardin dan Dr. Jumanto H. yang telah mengarahkan dan mengoreksi makalah ini. Juga kepada Istri dan anak saya yang telah memberikan dukungan.

KEPUSTAKAAN

- Bielot, H., P.R. Carey, C. Choma, H. Kaplan, T. Lessard, and M. Pozsgay. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem. J.* 260:87-91.
- Choma, C.T., W.K. Surewicz, P.R. Carey, M. Pozsgay, and H. Kaplan. 1990. Secondary structure of the entomocidal from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *J. Protein Chem.* 9:87-94.
- Cohen, M.B. 1996. Notes on resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Entomology and Plant Pathology Div. IRR1. Unpubl.*
- Convents, D., C. Houssier, I. Lasters, and M. Lauwereys. 1990. The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin. Evidence for two domain structure of the minimal toxic fragment. *J. Biol. Chem.* 265:1369-1375.
- Ellar, D.J. 1990. Pathogenicity determinants of entomopathogenic bacteria, pp. 298-302. *Proc. 5th. Int. Colloquim on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 20-24 August, 1990. Adelaide, Australia, Soc. Invertebrate Pathology.*
- English, L. and T.L. Readdy. 1989. Delta-endotoksin-induced leakage of K⁺ and H₂O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* 19:145-152.
- Garczynski, L.F., J.W. Crim, and M.J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin by protein blot-analysis. *App. Environ. Microbiol.* 57:2816-2820.
- Ge, A.Z., D. Rivers, R. Milne, and D.H. Dean. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. *J. Biol. Chem.* 266(27):17954-17958.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode action *Bacillus thuringiensis* endotoksin. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Gould, F., A. Martinez-Ramirez, A. Anderson, J. Ferre, F.J. Silva, and W.J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:7986-7988.
- Heimpel, A.M. and T.A. Angus. 1959. The site action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *J. Insect Pathol.* 1:152-170.
- Hofman, C., P. Luthy, R. Hutter, and P. Pliska. 1988a. Binding of the delta-endotoksin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassica*). *Eur. J. Biochem.* 173:85-91.
- Hofman, C., H. vander Bruggen, H. Hofte, J. van Rie, and S. Jansen. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin is correlated with the presence of high affinity binding site in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85: 7844-7848.
- Hofte, H., H. Greve, J. Seurinck, S. Jansens, and J. Mahilon. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoksin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* 161:273-280.
- Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53(2):242-255.
- Ihara, H., E. Kuroda, A. Wadano, and M. Himeno. 1993. Specific toxicity of delta-endotoksin from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. *Biochem. Biotechnol. Biochem.* 57:200-204.
- Kalshoven, E.A. 1986. Pests in Indonesia. PT. Ichtar Baru, Jakarta.
- Knowles, B.H. and D.J. Ellar. 1987. Colloid osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:509-518.
- Knowles, B.H., P.J.K. Knight, and D.J. Ellar. 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognises an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Proc. R. Soc. London B* 245:31-35.
- Lee, M.K., R.E. Milne, A.Z. Ge, and D.H. Dean. 1992. Location of *Bombyx mori* receptor binding region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin. *J. Biol. Chem.* 267:3115-3121.
- Li, J., J. Carroll, and D.J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoksin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5°A-resolution. *Nature (London),* 353:815-821.

- Lu, H., F. Rajamohan, and D.H. Dean. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. J. Bacteriol. 176: 5554-5559.
- McGaughey, W.H. and D.E. Johnson. 1994. Influence of crustal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strain on cross-resistance in Indian meal moths (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ Entomol. 87:535-540.
- Muthukumar, G. and K.W. Nickerson. 1987. The glycoprotein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates a lectinlike receptor in the larval mosquito gut. Appl. Environ. Microbiol. 53(11):2650-2655.
- Parker, M.W., F. Pattus, A.D. Tucker, and D. Tsernoglou. 1989. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. Nature (London) 337:93-96.
- Rajamohan, F., E. Alcantara, Mi K. Lee, Xue Jun Chen, A. Curtiss, and D.H. Dean. 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* cry IAb delta-endotoksin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. J. Bacteriol. 177(9):2276-2282.
- Schwarz, J.L., L. Garneau, I. Masson, and R. Brousseau. 1991. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to delta-endotoksin from *Bacillus thuringiensis*: Involvement of calcium and anionic channels. Biochim. Biophys. Acta. 1065:250-260.
- Stevens, C.F. 1991. Making a submicroscopic hole in one. Nature (London) 349:657-658.
- Sutaryo B., Sutrisno, B. Soegiarto, E. Listanto, dan B. Santoso. 1997. Perbaikan sifat beberapa isolat *Bacillus thuringiensis* untuk mendukung pemanfaatannya sebagai insektisida mikroba. Laporan hasil Penelitian, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.
- Tabashnik, B. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39:47-49.
- van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem. 186:239-247.
- van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. van Mellaert. 1990a. Receptors on brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin. appl. Environ. Microbiol. 56: 1378-1385.
- van Rie, J., W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett, and H. van Mellaert. 1990b. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247:72-74.
- Wolfersberger, M.G.C., C. Hofmen, and P. Luthy. 1986. Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larva midgut. Zentrabl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A Bf I. Suppl. 15:237-238.
- Wolfersberger, M.G., P. Luthy, A. Maure, P. Parenti, F.V. Sacchi, B. Giordona, and G.M. Hanozez. 1987. Preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) from larval lepidopteran midgut. Comp. Biochem. Biophys. 86A:301-308.
- Wolfersberger, M.G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoksin to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites of midgut brush border membranes for the toxin. Experientia 46:475-477.