

Isolasi Gen Penyandi Toksin Insektisidal dari Bakteri Simbion Nematoda Patogen Serangga

Etty Pratiwi, Alina Akhdiya, I Made Samudra, dan Budihardjo Soegiarto

ABSTRAK

Photorhabdus sp. merupakan bakteri simbion nematoda patogen serangga yang diketahui memiliki toksin insektisidal berspektrum luas yang dapat membunuh beberapa macam serangga hama tanaman pangan, di antaranya *Cylas*, *Schirpophaga*, *Ostrinia*, *Spodoptera litura*, dan *Lirhiomyza*. Toksin tersebut berpotensi besar sebagai agen biokontrol, bahan *sprayable products* maupun sebagai sumber gen untuk tanaman transgenik. Sebagai tahap awal dari pengklonan gen yang berhubungan dengan toksin insektisidal dilakukan beberapa penelitian pendahuluan, yaitu pemurnian toksin insektisidal dan disain primer PCR spesifik. Hasil pemurnian toksin dari tiga isolat *Photorhabdus* sp. dengan teknik kromatografi (filtrasi gel) menggunakan AKTA Purifier menunjukkan pola kromatogram yang hampir sama, yakni terelusi pada volume 38-40 ml. Selain itu telah diperoleh dua primer PCR spesifik untuk *Photorhabdus* yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *mcf* atau *makes caterpillars floppy*. Urutan nukleotida masing-masing primer ini adalah sebagai berikut: primer 1: 5'-ACGCTCATCACCCCAAAA-3', primer 2: 5'-TGTCATGCCCCGTACAA-3'. Amplifikasi menggunakan kedua primer ini menghasilkan amplicon tunggal berukuran 789 bp. Diperolehnya toksin insektisidal yang sudah murni serta primer PCR yang spesifik ini diharapkan dapat mempercepat waktu kloning gen penyandi toksin insektisidal dari *Photorhabdus* sp.

Kata kunci: *Photorhabdus* sp., bakteri simbion, toksin insektisidal, PCR primer.

ABSTRACT

Frequently and high dose use of synthetic pesticide is one of the factors causing low quality of land for agricultural production. One of the efforts to reduce dependence on chemical pesticides is application of biological control or biopesticide. Naturally many bacteria produce insects toxins that can be used as biopesticides. Bacteria that symbiotically associate with specific nematodes (*Photorhabdus* sp. or *Xenorhabdus* sp.) with its many insect toxins now provides some options, because their broad-spectrum toxins can be used to kill insects ranging from Lepidoptera, Coleoptera to Dictyoptera. The insecticidal toxin genes from symbiotic bacteria entomopathogenic nematodes would be used as material for sprayable agent or biocontrol agent and construction of insect resistant transgenic plant. We have purified the insecticidal toxins from three isolates of *Photorhabdus* sp. employing AKTA Purifier System. All of the toxins have the similar chromatogram patterns; they were eluted at volume 38-40 ml. We have designed two PCR primers, i.e. primer reverse (5'-ACGCTCATCACCCCAAAA-3') and primer forward (5'-TGTCATGCCCCGTACAA-3') to detect *mcf* gene of *Photorhabdus* sp. Amplification of DNA genomic of *Photorhabdus* sp. using these primers generated a 789 bp-amplicon.

Key words: *Photorhabdus* sp., entomopathogenic bacteria, insecticidal toxins, PCR primer.

PENDAHULUAN

Photorhabdus dan *Xenorhabdus* adalah dua kerabat bakteri dari kelompok *Enterobacteriaceae* yang banyak diteliti karena kemampuannya sebagai agen biokontrol dan penghasil faktor virulensi (kompleks toksin insektisidal, protease, lipase, dan lipopolisakarida), serta antibiotik jenis baru maupun antifungi (Daborn *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2003). Kedua bakteri ini merupakan bakteri simbion nematoda patogen serangga atau NPS yang masing-masing termasuk ke dalam famili *Heterorhabditidae* dan *Steinernematidae* (Forst dan Neilson 1996).

Penelitian terhadap toksin dan sekuen gen *Xenorhabdus nematophila* dan *Photorhabdus luminescens* yang dilakukan oleh peneliti di luar negeri menunjukkan bahwa kedua bakteri ini memiliki beberapa toksin insektisidal yang berbeda dalam hal *mode of action*, lokasi sasaran maupun serangga targetnya. Uji toksisitas beberapa toksin murni menunjukkan bahwa toksin-toksin tersebut sangat ampuh terhadap larva *Pieris brassicae*, *Menduca sexta*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, serta tiga spesies nyamuk, termasuk nyamuk malaria Afrika (Daborn *et al.* 2002; Ribeiro *et al.* 2003; Seargeant *et al.* 2001, Waterfield *et al.* 2001). Bahkan para peneliti di

Dow AgroScience LLC (Indianapolis, USA) telah berhasil mengintroduksi gen penyandi toksin insektisidal (disebut sebagai toksin A) ke dalam tanaman model *Arabidopsis thaliana* yang dapat tereksresi serta melindungi tanaman transgenik tersebut dari beberapa serangga hama termasuk *tobacco hornworm* atau *M. sexta* (Liu *et al.* 2003).

Di BB-Biogen telah dikoleksi beberapa isolat *Photorhabdus* sp. *indigenus* penghasil toksin insektisidal yang terbukti efektif terhadap berbagai larva serangga hama tanaman pangan, antara lain *Cylas*, *Schirpophaga*, *Ostrinia*, *Spodoptera litura*, dan *Lirhiomyza* (Samudra *et al.* 2003; Fallon *et al.* 1995, Chaerani dan Waluyo 1996). Toksin insektisidal tersebut berpotensi besar sebagai agen biokontrol, bahan *sprayable products* maupun sebagai sumber gen untuk tanaman transgenik.

Teknologi rekayasa genetika tanaman memungkinkan pengintegrasian gen-gen yang berasal dari organisme lain untuk perbaikan sifat tanaman. Oleh karena itu, eksplorasi, identifikasi, dan isolasi gen-gen yang memiliki potensi untuk tujuan ini sangat diperlukan. Salah satu gen yang sangat potensial adalah gen yang berasal dari bakteri simbiosis NPS, karena gen ini menghasilkan toksin berspektrum luas dan berdaya bunuh cepat atau efektif untuk mengendalikan hama utama pengganggu tanaman. Dengan diisolasinya gen ini, maka akan menambah ketersediaan sumber gen yang dapat digunakan dalam pembentukan tanaman transgenik tahan hama.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan gen penyandi toksin insektisidal yang dapat digunakan sebagai bahan untuk mengembangkan agen biokontrol baru atau sebagai sumber gen dalam pembentukan tanaman transgenik tahan hama.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Juni 2004 hingga Maret 2005 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Entomologi, BB-Biogen, Bogor.

Bahan dan Metode

Media tumbuh dan penyimpanan. Isolat *Photorhabdus* sp. secara rutin disimpan dan diremajakan pada medium padat NBT (*Nutrient Bromthymol Blue Triphenyltetrazolium Chloride*). Sedangkan sebagai media pertumbuhan dan produksi toksin digunakan media cair Luria Bertani (LB). Sebanyak 200 ml media cair LB diinokulasi dengan 100 ml kultur *Photorhabdus* sp. umur 24 jam yang sebelumnya ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB). Media untuk menumbuhkan *Photorhabdus* sp. ini selalu disuplementasi dengan *Bromthymol Blue* (BTB) 0,025% dan *Triphenyltetrazolium Chloride* (TZC) 0,004%. Kultur diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang (sekitar 25-28°C) pada *rotary orbital shaker*.

Purifikasi Toksin Insektisidal. Toksin insektisidal *Photorhabdus* sp. diperbanyak pada media cair LB. Kultur diinkubasi dalam *rotary orbital shaker* pada suhu ruangan. Setelah diinkubasi selama 48 jam kultur disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, suhu 4°C selama 30 menit. Endapan yang terbentuk dibuang, sedangkan supernatannya ditambah dengan ammonium sulfat hingga konsentrasi mencapai 70% (w/v) sambil diaduk. Campuran supernatan dan ammonium sulfat lalu disentrifugasi kembali setelah diinkubasikan semalam di refrigerator untuk mengumpulkan proteinnya. Endapan protein dilarutkan dalam 0,05 M PBS (pH 7,3). Ekstrak toksin difiltrasi dengan kolom DEAE-Sephacel (Amersham), selanjutnya dilakukan uji toksisitas terhadap beberapa larva serangga hama.

Disain Primer PCR. Data sekuen DNA lengkap gen yang berhubungan dengan toksin insektisidal yang telah ada di *GenBank* dijadikan acuan untuk mengetahui daerah yang konservatif pada beberapa spesies *Photorhabdus* sp. Tahap selanjutnya adalah mendisain primer PCR berdasarkan data sekuen DNA yang konservatif menggunakan perangkat lunak Primer 3 (<http://www.justbio.com>).

Optimasi PCR untuk Amplifikasi DNA. Kondisi optimum PCR yang meliputi tahap-tahap *pre-start*, denaturasi, *annealing*, *elongation*, dan post-PCR akan ditentukan selain berdasarkan kandungan %G + C DNA *Photorhabdus* sp., juga berdasarkan T_m (*melting point*) atau titik leleh dari primer yang digunakan. Persiapan reaksi PCR (selain tahap penambahan DNA) dikerjakan di *laminar-flow*. Setiap pengujian PCR selalu mengikutsertakan kontrol negatif tanpa DNA. Sebanyak 10 ml *aliquot* hasil amplifikasi PCR *dirunning* pada 1,5% gel agarosa, kemudian dilakukan *staining* dengan larutan etidium bromida dan divisualisasikan menggunakan UV transilluminator. Kondisi PCR pada penelitian ini adalah prestart 94°C selama 2 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 30 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit, dan post-PCR 72°C selama 7 menit.

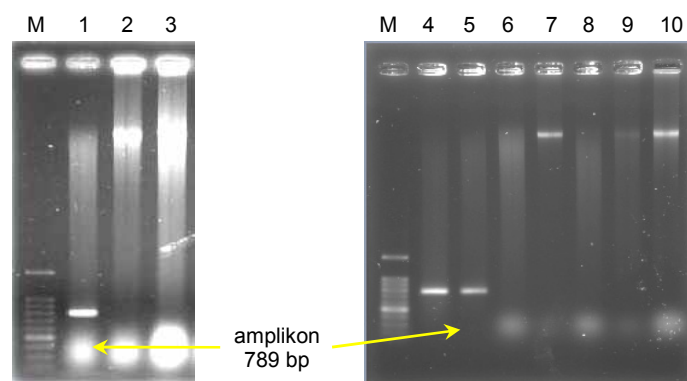
Bioasai Toksin. Sebelum dilakukan uji toksisitas, toksin diencerkan hingga 10^{-1} dengan larutan PBS. Kemudian toksin diberikan ke larva serangga dengan cara injeksi (Samudra *et al.* 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

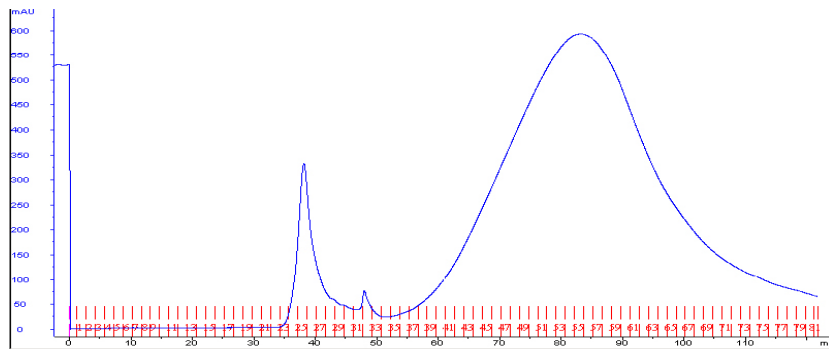
Introduksi *Escherichia coli* rekombinan yang mengandung gen *mcf* (*makes caterpillar floppy*) dari *Photorhabdus* pada larva *Manduca sexta* dapat mematikan larva tersebut (Daborn *et al.* 1992). Oleh karena itu, pada penelitian ini difokuskan pada disain primer gen *mcf*, karena dari data sekuen lengkap genom yang ada di *GenBank* dengan *Accession Number* AF503504 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) diketahui bahwa gen *mcf* hanya dimiliki oleh *Photorhabdus luminescens*. Selanjutnya primer PCR yang spesifik ini diharapkan dapat digunakan untuk melakukan identifikasi bakteri *P. luminescens* dan mempercepat waktu kloning gen penyandi toksin insektisidal dari *Photorhabdus*. Dua primer PCR spesifik yang telah berhasil didisain, yakni Primer *mcf1*: 5'-ACGCTCATCACCCCAAAA-3'; Primer *mcf2*: 5'-TGTCATGCCCGCTACAA-3'.

Amplifikasi DNA genom *Photorhabdus* menggunakan kedua primer PCR pada suhu *annealing* 60°C menghasilkan ampikon berukuran 789 bp (Gambar 1). Hasil amplifikasi PCR terhadap beberapa isolat *Photorhabdus* memperlihatkan bahwa ada tiga isolat positif memiliki gen *mcf*, yaitu isolat HJ, AN, dan CM. Kromatogram hasil pemurnian toksin insektisidal dari isolat HJ, AN, dan CM menunjukkan adanya kemiripan toksin, yaitu ketiga toksin terelusi pada volume 38-40 ml (Gambar 2, 3, dan 4).

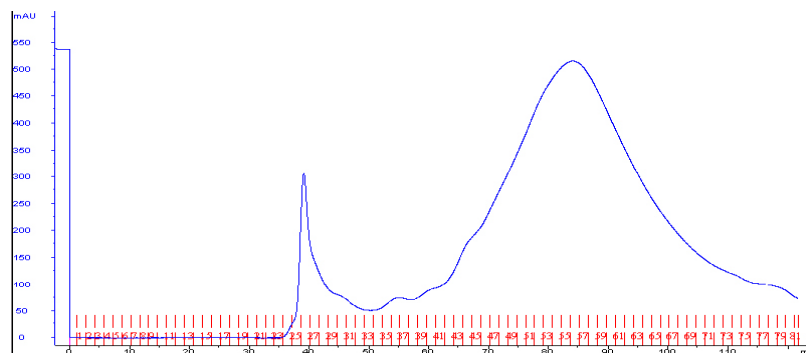
Pengujian fraksi toksin yang sudah dimurnikan terhadap hama gudang, *Tenebrio molitor* (ulat Hongkong), menunjukkan bahwa toksin dari isolat AN dapat mematikan semua serangga uji dalam waktu 48 jam setelah aplikasi, sedangkan 2 isolat lainnya bereaksi lebih lambat (Tabel 1).



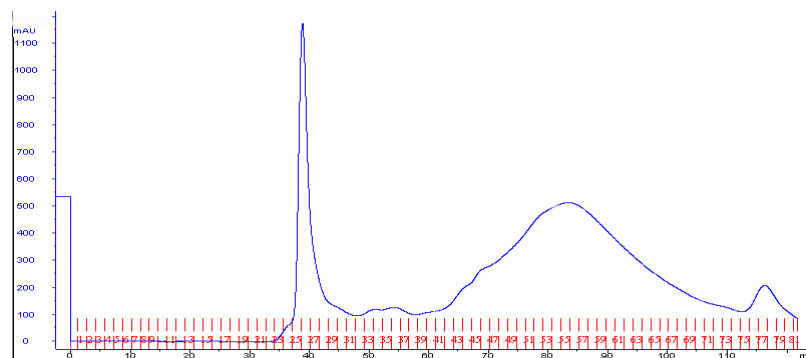
Gambar 1. Elektroforesis hasil amplifikasi PCR beberapa isolat *Photorhabdus* sp. menggunakan primer *mcf1* dan *mcf2*. M = 100 bp DNA marker, 1 = HJ (Pelabuhan Ratu), 2 = LTK2 (Lampung), 3 = LTK6 (Lampung), 4 = AN (Pelabuhan Ratu), 5 = CM (Pelabuhan Ratu), 6 = HJD (Lampung), 7 = NMD6 (Lampung), 8 = PL ul2 (Pelabuhan Ratu), 9 = PL ul10 (Pelabuhan Ratu), 10 = LP TK7 (Lampung).



Gambar 2. Kromatogram hasil purifikasi toksin insektisidal dari isolat AN.



Gambar 3. Kromatogram hasil purifikasi toksin insektisidal dari isolat CM.



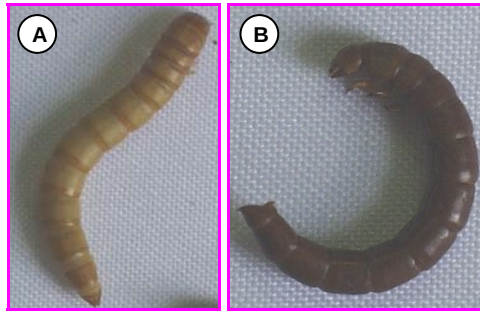
Gambar 4. Kromatogram hasil purifikasi toksin insektisidal dari isolat HJ.

Tabel 1. Hasil bioasai toksin insektisidal terhadap ulat Hongkong (*Tenebrio molitor*)

Isolat	Volume elusi (ml)	Persentase kematian ulat	
		48 jam setelah injeksi	72 jam setelah injeksi
Isolat AN	38	100	100
Isolat CM	39	80	100
Isolat HJ	40	90	100

Matinya ulat *T. molitor* dicirikan oleh perubahan warna pada tubuh ulat, dari coklat muda menjadi coklat tua (Gambar 5).

Daya bunuh yang cepat dari toksin insektisidal *Photorhabdus* ini mirip dengan daya bunuh insektisida organik sintetik, sehingga bakteri ini mempunyai prospek yang baik untuk dikembangkan sebagai bioinsektisida yang dapat menggantikan insektisida organik sintetik.



Gambar 5. Perubahan warna tubuh ulat *T. molitor* setelah 48 jam diinjeksi dengan toksin insektisidal dari *Photorhabdus*. A = ulat sehat, B = ulat yang mati setelah diinjeksi toksin.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini diperoleh dua primer PCR untuk mendeteksi gen *mcf* dari *Photorhabdus* sp., yaitu primer *mcf1*: 5'-ACGCTCATCACCCCAAAA-3' dan primer *mcf2*: 5'-TGTCATGCCCGCTA CAA-3'. Amplifikasi DNA genom *Photorhabdus* menggunakan kedua primer PCR pada suhu *annealing* 60°C menghasilkan amplikon tunggal berukuran 789 bp. Kromatogram hasil pemurnian toksin insektisidal dari isolat HJ, AN, dan CM menunjukkan adanya kemiripan toksin, yaitu ketiga toksin terelusi pada volume 38-40 ml.

Untuk mempertinggi peluang keberhasilan isolasi gen penyandi toksin insektisidal, pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan konstruksi pustaka genom DNA *Photorhabdus* sp. Oleh karena penapisan transforman atau klon yang positif mengandung gen penyandi toksin insektisidal di antaranya dilakukan menggunakan teknik *NCM dot blot*, maka perlu dilakukan pembuatan antibodi poliklonal. Sedangkan data karakterisasi toksin (BM protein) diperlukan untuk verifikasi gen putatif penyandi toksin insektisidal.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaerani dan Waluyo. 1996.** Potensi nematoda patogen serangga *Steinernema* dan *Heterorhabditis* (*Rhabditidae*: *Steinematidae*, *Heterorhabditidae*) sebagai pengendali hama lanas ubi jalar *Cylas formicularis* F (*Coleoptera*: *Apinidae*). Disajikan dalam Seminar Nasional Pengendalian Hayati Yogyakarta, 25-26 November.
- Daborn, P.J., N. Waterfield, A. Blight, and R.H. French-Constant. 2003.** Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J. Bacteriol.* 183:5834-5839.
- Daborn, P.J., N. Waterfield, C.P. Silva, C.P.Y. Au, S. Sharma, and R.H. French-Constant. 2002.** A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (*mcf*), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10742-10747.
- Fallon, D.F., C. Griffin, Chaerani, and M. Downes. 1995.** Field control potential of indigenous entomopathogenic nematodes against rice stemborers in Java. Paper presented to the Society of Zoologists. p. 1-4.
- Forst, S., K. Neilson. 1996.** Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.* 60:21-43.
- Liu, D., S. Burton, T. Glancy, Z.S. Li, R. Hampton, T. Meade, and D.J. Merlo. 2003.** Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21:1222-1228.

- Ribeiro, C., M. Vignes, and M. Brehcelin. 2003.** *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell lysis. *J. Biol. Chem.* 278(5):33030-3039.
- Samudra, I.M., H. Meliana, T.P. Priyatno, dan B. Sugiharto. 2003.** Patogenitas dan potensi nematoda patogen serangga (NPS), *Steinernema* sp., isolat Pelabuhan Ratu untuk pengendalian *Spodoptera litura* F. Disampaikan pada pada Seminar Nasional Balitkabi Malang, 16-17 September.
- Sergeant, M., P. Jarrett, M. Ousley, J. Alun, and W. Morgan. 2001.** Interactions of insecticidal toxin gene products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3344-3349.
- Waterfield, N., A. Dowling, S. Sharma, P.J. Daborn, U. Potter, and R.H. Ffrench-Constant. 2001.** Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5017-5024.