

Isolasi dan Purifikasi Inhibitor α -amilase dari Biji Kacang *Phaseolus vulgaris*

Bahagiawati

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Isolation and Purification of α -amylase Inhibitor from Common Bean, *Phaseolus vulgaris*, Seed. Bahagiawati.

Plant genetic engineering technologies enable of introducing insect resistance genes into crop plants. The *cry* genes, genes encoding for inhibitor of digestive enzymes of a target insect that were isolated from *Bacillus thuringiensis* can be used for this purpose. Seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*) contain a glycoprotein that inhibits activity of α -amylase of insects. A α -amylase inhibitor was purified from the common bean seeds. The purified α -amylase inhibitor was then fed to cowpea storage weevil, *Callosobruchus maculatus*. The results showed a lengthened larval development time inside the seed and caused mortality to the insect larvae. This experiment suggests that the α -amylase inhibitor gene from the common bean seeds could be used as a candidate gene for genetic engineering of plant resistance to bruchid insects.

Key words: α -amylase inhibitor, common bean, storage pest *Callosobruchus maculatus*.

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam menaikkan produksi pertanian adalah serangan hama dan penyakit. Kerugian yang disebabkan oleh serangan hama di dunia diperkirakan 13% dari produksi total (Gatehouse *et al.* 1994). Di Amerikat Serikat diperkirakan lebih dari 10 ribu juta dolar per tahun digunakan untuk mengatasi persoalan hama tanaman. Salah satu cara untuk mengendalikan hama adalah menanam varietas tanaman yang tahan atau resisten terhadap hama tertentu.

Dengan perkembangan ilmu dan teknologi telah membuka kesempatan menggunakan teknologi rekayasa genetika untuk merakit tanaman tahan hama. Teknologi ini mempunyai beberapa kelebihan dalam beberapa hal dibandingkan dengan teknologi konvensional, yaitu (1) memperluas pengadaan sumber gen ketahanan karena dengan teknologi ini kita dapat menggunakan gen ketahanan dari berbagai sumber, tidak hanya dari tanaman dalam satu spesies, tetapi juga dari spesies, genus atau ordo lain atau dari bakteri, fungi, dan mikroorganisme lainnya; (2) dapat memindahkan gen spesifik ke lokasi yang spesifik pula di

tanaman; (3) dapat menelusuri stabilitas gen yang dipindahkan atau yang diintroduksi ke tanaman dalam setiap generasi tanaman; (4) memungkinkan mengintroduksi beberapa gen tertentu dalam satu *event* transformasi sehingga dapat memperpendek waktu perakitan tanaman dengan ketahanan ganda; dan (5) mengikuti dan mempelajari perilaku gen yang diintroduksi di dalam lingkungan tertentu, misalnya kemampuan gen di dalam tanaman tertentu untuk pindah ke tanaman yang berbeda spesies (*outcrossing*), serta dampak negatif dari gen tersebut di dalam tanaman tertentu terhadap lingkungan dan organisme bukan sasaran (Bahagiawati 2000).

Sejak dilaporkan pertama kali tentang pembuatan tanaman transgenik pada tahun 1984 (Horsch *et al.* 1984), teknologi rekayasa genetik berkembang pesat dalam bidang ini. Perakitan tanaman transgenik tahan hama merupakan salah satu bidang yang mendapat perhatian besar dalam perbaikan tanaman. Gen tahan hama tanaman yang berhasil diintroduksi ke tanaman sampai saat ini pada umumnya mempunyai mekanisme menghambat perkembangan hama melalui gangguan sistem pencernaan serangga. Sebagai contoh, gen yang berasal dari *Bacillus thuringiensis* dan gen yang berasal dari tanaman. Pada saat ini terdapat dua kelompok besar gen tanaman yang dipakai untuk merakit tanaman transgenik tahan hama, yaitu inhibitor enzim pencernaan dan lektin. Telah diketahui beberapa protein dari tanaman yang mempunyai pengaruh negatif terhadap pertumbuhan dan perkembangan serangga, di antaranya adalah inhibitor α -amilase. Inhibitor α -amilase secara alami ditemukan pada jaringan tanaman, terutama pada biji dan ubi (Ryan 1989).

Inhibitor α -amilase adalah protein yang menghambat enzim amilase di dalam saluran pencernaan (*midgut*) serangga. Enzim amilase diperlukan oleh serangga, terutama serangga yang makan biji-bijian dan ubi yang kaya dengan pati. Pati ini harus hidrolisis menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana (kecil) seperti disakarida dan monosakarida, agar dapat digunakan dalam sistem metabolisme serangga. Dengan dihambatnya pemecahan pati oleh inhibitor α -amilase maka serangga tidak mendapatkan kebutuhan karbohidratnya, sehingga dapat berakibat fatal bagi serangga tersebut.

Beberapa jenis inhibitor α -amilase telah diisolasi dari berbagai biji tanaman, seperti *Phaseolus vulgaris* dan *Triticum aestivum*. Inhibitor α -amilase dari *P. vulgaris* menghambat aktivitas amilase pada ekstrak kasar dari *midgut* serangga Lepidoptera, seperti *Spo-doptera littoralis*, *Agrotis ipsilon*, dan *Plodia inter-punctella* (Gutierrez *et al.* 1993). Inhibitor ini juga menghambat aktivitas amilase di *midgut Callosobru-chus maculatus* dan *Tribolium confusum* (Gatehouse *et al.* 1986).

Tujuan penelitian ini adalah (1) mengisolasi inhi-bitor α -amilase dari kacang *P. vulgaris* dan (2) menguji pengaruh inhibitor α -amilase terhadap hama gudang *C. maculatus*.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan Purifikasi Inhibitor α -amilase

Biji matang *P. vulgaris* digiling menjadi tepung yang sangat halus. Tepung ini kemudian dicampur dengan bufer Na-fosfat pH 6,7 dan disentrifus dengan kecepatan 11.000 g selama 20 menit. Supernatannya di-fraksinasi dengan ammonium sulfat pada 20-60% sa-turasi. Endapan yang didapatkan dilarutkan ke dalam bufer 20 mM Na-fosfat dan didialisis dalam bufer yang sama selama 24 jam sebelum diaplikasikan pada beberapa kolom untuk dimurnikan.

Pemurnian menggunakan 3 tahap kolom. Kolom pertama adalah DEAE-sepharose, kemudian dengan kolom afiniti, dan kembali ke kolom DEAE. Pada ko-lom yang pertama, bufer pelekatan (*binding buffer*) yang digunakan adalah bufer 20 mM Na-fosfat pH 6,7 dan bufer pelepasan (*elution buffer*) yang digunakan adalah 0,25 mM Na-fosfat pH 6,7. Kolom afiniti yang digunakan adalah concanovalin A. Bufer pelekatan adalah bufer 20 mM Na-fosfat yang mengandung 0,5 M NaCl. Bufer pelepasan pada afiniti kolom ini adalah 0,1 M Na-fosfat yang mengandung 0,1 M metil-D-mano-pironosida. Purifikasi dilanjutkan dengan kolom DEAE-sepharose kembali. Pada tahap ini bufer pelekatan sa-ma dengan yang digunakan di kolom pertama namun bufer pelepasannya dilakukan secara bertahap linier 0,02-0,25 M Na-fosfat pH 6,7.

SDS-Elektroforesis

Hasil purifikasi divisualisasi dengan gel SDS-elek-troforesis untuk mengetahui bahwa hasil purifikasi adalah inhibitor α -amilase. Di sini akan diperlihatkan bobot molekul hasil purifikasi tersebut. SDS-elektrofo-resis ini dilaksanakan menurut metode Laemmli (1970), yaitu dengan menggunakan 15% lembaran gel akrilamida. Sampel yang akan dielektroforesis sebe-

lumnya dipanaskan pada suhu 100°C dalam 1,7% SDS. Gel kemudian diwarnai dengan commasie blue R-250.

Uji Aktivitas Inhibitor α -amilase

Pengujian dilakukan untuk mengetahui aktivitas inhibitor α -amilase hasil purifikasi. Beberapa kon-sentrasi inhibitor α -amilase dicampur dengan larutan α -amilase pankreas babi sebanyak 150 ng dalam bufer yang mengandung 10 mM suksinat, 20 mM CaCl_2 ; 0,5 M NaCl pH 5,6; dan 1 mg BSA. Pencampuran dalam bufer dilakukan dengan volume akhir 1 ml. Campuran ini di-inkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C kemu-dian dicampur dengan larutan pati kentang (1%) da-lam larutan 50 mM Na-maleat, 10 mM CaCl_2 pH 6,9. Reaksi ini dihentikan dengan menambahkan larutan 0,5 ml reagen yodium. Kerapatan optik larutan ditentu-kan pada OD_{546} dengan spektrofotometer. Berdasar-kan angka pada kurva OD_{546} , persentase inhibit (peng-hambatan) ditentukan. Untuk pembandingan penghambatan 100% dipakai OD_{546} dari larutan pati, bufer, dan α -amilase tanpa inhibitor, sedangkan untuk pemban-ding penghambatan 0% dipakai OD_{546} dari larutan pati, bufer, inhibitor tanpa α -amilase. Pada penghambatan 0% memberikan larutan yang sangat jernih sedangkan penghambatan 100% memberikan warna larutan yang sangat biru.

Pengujian Toksisitas Inhibitor α -amilase

Pembuatan biji buatan. Sepuluh biji buatan (masing-masing 30 mg) pada setiap perlakuan disiap-kan dengan metode Shade *et al.* (1986). Biji buatan di-buat dari biji kacang tunggak (*cowpea, Vigna unguicu-lata*). Mula-mula biji digiling sampai halus kemudian 400 mg tepung dibuat pasta dengan menambahkan larutan inhibitor α -amilase dengan konsentrasi 0,0; 0,4; 0,8; dan 1%. Pasta ini kemudian dimasukkan ke dalam cetakan teflon, dibekukan dalam nitrogen cair, dan di-keringbekukan (*frozen-dried*) selama 48 jam. Biji buatan tersebut ditumbuk halus menjadi tepung kem-bali dan 30 mg tepung dicetak dengan cetakan tangan *Parr pellet press*. Biji buatan yang tercetak masing-masing dilapisi larutan gelatin 8%.

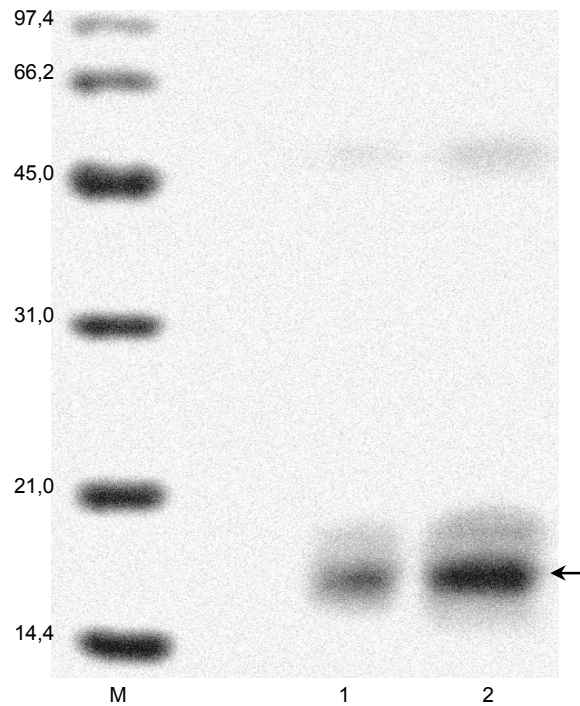
Infestasi dengan serangga *C. maculatus*. Masing-masing biji buatan diinfestasi dengan telur serangga *C. maculatus*. Perkembangan larva di dalam biji diamati dengan alat *Purdue Biomonitor*, yaitu alat elektronik yang dapat mengamplifikasi bunyi ultraso-nik yang dihasilkan dari aktivitas makan larva di dalam biji (Shade *et al.* 1990). Pengamatan dilakukan pada monitor komputer yang terhubung dengan biomonitor. Pengamatan ini dilakukan setiap hari sampai larva menjadi dewasa. Persentase kematian larva juga di-

amati dengan menghitung jumlah serangga yang hidup dan yang mati.

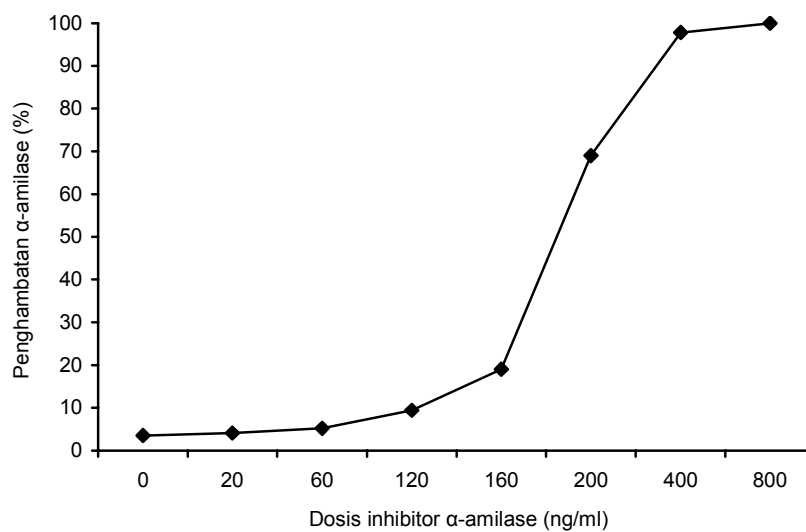
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan purifikasi adalah protein yang mempunyai bobot molekul 18 kD hasil kolom terakhir

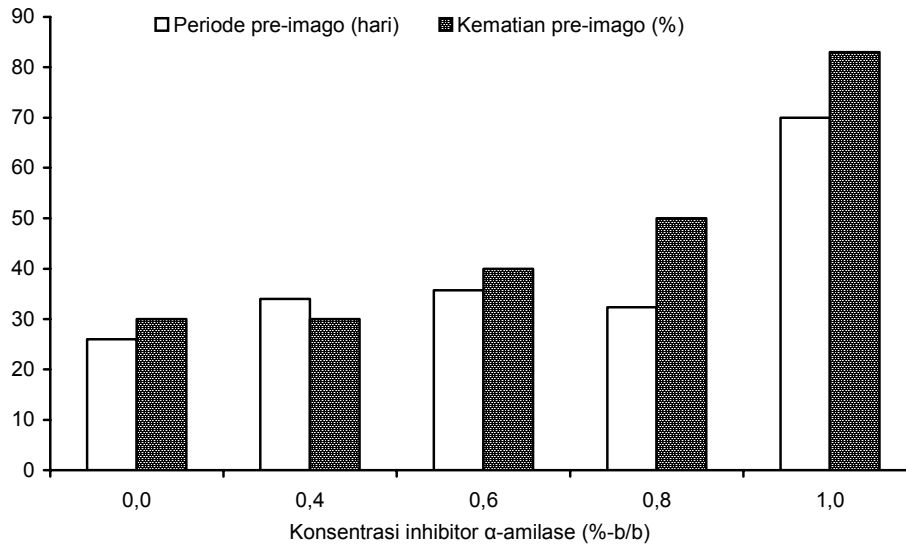
(Gambar 1). Pada Gambar 2 ditunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai aktivitas inhibitor α -amilase. Aktivitas protein ini hampir mencapai hambatan 100% pada konsentrasi inhibitor α -amilase 400 ng/ml. Hal ini menunjukkan bahwa protein yang dihasilkan adalah inhibitor α -amilase karena dapat menghambat aktivitas α -amilase dari pankreas babi (*porcine*). Inhibitor



Gambar 1. Hasil SDS-elektroforesis dari isolasi dan pemurnian inhibitor α -amilase dari *P. vulgaris*. M = penanda bobot molekul (kD), 1 dan 2 = hasil purifikasi dari 2 kali pengumpulan sampel, → = menunjukkan pita protein dengan bobot molekul 18 kD.



Gambar 2. Aktivitas penghambatan dari inhibitor α -amilase terhadap α -amilase dari pankreas babi.



Gambar 3. Pengaruh inhibitor α -amilase terhadap hama *C. maculatus* dalam biji buatan.

α -amilase ini juga menghambat pertumbuhan serangga hama gudang *C. maculatus* (Gambar 3). Penghambatan ini ditunjukkan dengan bertambah panjangnya periode larva yang hidup dalam biji buatan dan persentase larva yang mati. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa inhibitor dengan konsentrasi 1% (b/b) dapat memperlambat fase larva selama 34 hari. Periode ini dua kali lebih panjang dari waktu yang dibutuhkan oleh larva yang hidup pada biji buatan yang tidak mengandung inhibitor α -amilase (biji buatan kontrol). Inhibitor α -amilase ini tidak saja memperlambat pertumbuhan serangga, tetapi juga menyebabkan kematian serangga. Sebanyak 83% serangga yang makan biji buatan yang mengandung 1% inhibitor α -amilase mengalami kematian sehingga tidak dapat tumbuh menjadi serangga dewasa.

Inhibitor α -amilase dari *P. vulgaris* telah berhasil diisolasi dan purifikasi oleh beberapa laboratorium dengan bobot molekul yang agak bervariasi. Ishimoto dan Kitamura (1989) menghasilkan inhibitor α -amilase dengan bobot molekul 17 kD, sedangkan Moreno dan Chrispeels (1989) menjumpai 5 pita protein dengan bobot molekul 14 sampai 18 kD. Inhibitor α -amilase hasil penelitian ini menunjukkan bobot molekul 18 kD. Di samping pita berukuran 18 kD, dihasilkan juga sebuah pita dengan bobot molekul lebih kurang 50 kD. Pita protein ini kemungkinan adalah protein dalam bentuk asli (*native*). Moreno dan Chrispeels (1989) juga menemukan bahwa senyawa dalam bentuk asli dari inhibitor α -amilase mempunyai bobot molekul sekitar 43-50 kD yang terdiri dari subunit berukuran 15 dan 18 kD. Subunit ini diduga dalam bentuk trimer atau tetramer dari polipeptida baik yang serupa mau-

pun berbeda bobot molekulnya. Protein dalam bentuk asli ini akan terurai menjadi subunitnya jika dipanaskan dalam suhu, pH tertentu atau bila ada detergen/SDS (Moreno dan Chrispeels 1989).

Tanaman kacang tunggak (*V. unguiculata*) merupakan tanaman kacang-kacangan penting di dunia, seperti di Afrika, India, Bangladesh, Birma, China, Srilanka, Indonesia, Korea, Nepal, Pakistan, Filipina, Thailand, Australia, Amerika Latin, Karibia, dan Amerika Serikat (Rachie 1987). Salah satu hama penting pada tanaman ini adalah *C. maculatus*. Hama ini dapat menyerang tanaman di lapang, namun kerusakan yang lebih besar terjadi pada biji yang disimpan di gudang. Kerusakan oleh hama ini disebabkan karena larva hama hidup dan makan di dalam biji sehingga biji tidak layak dimakan manusia dan tidak laku dijual. Di beberapa negara berkembang seperti negara di Afrika, kacang ini merupakan salah satu makanan pokok untuk sumber protein. Pengendalian dengan insektisida sangat sulit dilakukan, karena hama hidup di dalam biji. Di samping itu, petani tidak mampu membeli pestisida. Pengendalian dengan menanam varietas tahan merupakan metode pengendalian yang sederhana dan mudah dilakukan, namun tidak banyak plasma nutfah yang dapat digunakan sebagai sumber gen tahan. Rekayasa genetik untuk merakit tanaman tahan dalam hal ini merupakan suatu terobosan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa inhibitor α -amilase dapat diisolasi dan dimurnikan dan tetap menunjukkan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan hama gudang *C. maculatus*. Pada konsentrasi 1% inhibitor α -amilase hasil isolasi dapat memperpanjang waktu serangga untuk menyelesaikan siklus hidupnya.

Biasanya serangga yang lebih panjang untuk menyelesaikan periode pre-imago akan menghasilkan imago yang tidak normal, dan mempunyai laju reproduksi yang rendah. Periode larva untuk menjadi dewasa pada biji buatan yang tidak mengandung inhibitor α -amilase adalah 34 hari, sedangkan pada biji buatan yang mengandung 1% inhibitor α -amilase 70 hari, hampir dua kali lipat waktu yang dibutuhkan oleh serangga hidup tanpa inhibitor α -amilase. Inhibitor ini juga meningkatkan persentase kematian larva. Pada konsentrasi 1% kematian larva adalah 83%, sedangkan pada biji buatan yang tidak mengandung inhibitor α -amilase adalah 30%. Senyawa ini menghambat pertumbuhan serangga dengan menghambat metabolisme pati dari dalam biji. Pati yang dimakan serangga tidak dapat dicernakan menjadi polimer karbohidrat yang lebih rendah bobot molekulnya seperti disakarida (maltosa), dan monosakarida (glukosa, fruktosa) sehingga hasil metabolisme pati tidak dapat digunakan oleh serangga untuk kebutuhan hidupnya. Hal serupa juga ditemukan oleh Ishimoto dan Kitamura (1989) di mana inhibitor α -amilase tidak hanya menghambat pertumbuhan hama gudang *C. maculatus*, tetapi juga hama gudang lain seperti *C. chinensis* dan *Z. subfasciatus*. Gen yang mengkode inhibitor α -amilase ini telah diklon dan diintroduksi ke dalam tanaman seperti kapri (*garden pea*) dan kacang hijau secara molekuler melalui transformasi tanaman. Tanaman hasil transformasi menunjukkan ketahanan terhadap beberapa hama gudang (Shade *et al.* 1994; Schroeder *et al.* 1995, Ishimoto *et al.* 1996).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian disimpulkan sebagai berikut:

1. Telah berhasil diisolasi dan dimurnikan protein inhibitor α -amilase dengan bobot molekul 18 kD dari biji kacang *P. vulgaris*.
2. Inhibitor α -amilase tersebut telah dibuktikan dapat menghambat aktivitas α -amilase dari pankreas babi hingga 100%.
3. Inhibitor α -amilase ini dapat menghambat pertumbuhan dan meningkatkan persentase mortalitas serangga hama gudang *C. maculatus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. L.L. Murdock dan Dr. H. Koiwa atas bimbingannya sewaktu penulis mengadakan penelitian ini di Purdue University, Indiana, USA.

PUSTAKA

- Bahagiawati. 2000.** Peranan dan potensi *dietary insecticidal protein* dalam rekayasa genetika tanaman tahan hama. Buletin Agrobio 3(2):74-79.
- Gatehouse, A.M.R., K.A. Fenton, I. Jepson, and D.J. Paney. 1986.** The effect of α -amylase inhibitor on storage pests: Inhibition of α -amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. J. Sci. Food Agric. 37:727-734.
- Gatehouse, A.M.R., W.D.O. Hamilton, C.A. Newell, A. Merryweather, D. Boulter, and J.A. Gatehouse. 1994.** Approaches in insect resistance using transgenic plants. In Bevan, M.W., B.D. Harisson, and C.J. Leaver (Eds.). The Production and Uses of Genetically Transformed Plants. Chapman and Hall.
- Gutierrez, C., G. Garcia-Casado, R. Sanchez-Monge, L. Gomez, P. Castanera, and G. Salcedo. 1993.** Three inhibitor types from wheat endosperm are differentially active against α -amylase of Lepidoptera pests. Entomol. Exp. Appl. 66:47-52.
- Horsch, R.B., R.T. Fraley, S.G. Rogers, P.R. Sander, A. Lloyd, and H. Hoffman. 1984.** Inheritance of functional genes in plants. Science 223:496-498.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura. 1989.** Growth inhibitory effects of α -amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Appl. Ent. Zool. 24(3):281-286.
- Ishimoto, M., T. Sato, M.J. Chrispeels, and K. Kitamura. 1996.** Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. Entomol. Exp. Appl. 79:309-315.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Moreno, J. and M.J. Chrispeels. 1989.** A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7885-7889.
- Rachie, K.O. 1987.** Introduction cowpea: Research, production, and utilization. In Singh, S.R. and K.O. Rachie (Eds.). International Institute of Tropical Agriculture. John Wiley & Sons, New York..
- Ryan, C.A. 1989.** Proteinase inhibitor gene families: Strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. BioEssays 10(1):20-24.
- Schroeder, H.E., S. Gollasch, A. Moore, L.M. Tabe, S. Craig, D.C. Hardie, M.J. Chrispeels, D. Spencer, and T.J.V. Higgins. 1995.** Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). Plant Physiol. 107:1233-1239.
- Shade, R.E., L.L. Murdock, D.E. Foard, and M.A. Pomeroy. 1986.** Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae). Environ. Entomol. 89(5):1286-1291.

Shade, R.E., E.S. Ferguson, and L.L. Murdock. 1990.
Detection of hidden insect infestations by feeding-generated ultrasonic signals. *American Entomologist* Fall 1990:231-234.

Shade, R.E., H.E. Schroder, J.J. Puejo, L.M. Tabe, L.L. Murdock, T.J.V. Higgins, and M.J. Chrispeels. 1994.
Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Biotechnology* 12:793-796.
