



Pertumbuhan Bakteri *Photorhabdus luminescens* pada Berbagai Media dan Produksi Eksotoksin sebagai Racun Serangga

WARTONO DAN TRI PUJI PRIATNO

Balai Besar Boteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

(diterima Apri 2009, disetujui Juni 2009)

ABSTRACT

Growth of *Photorhabdus luminescens* on several culture media and its exotoxin production as insecticide. The aim of this experiment was to find out the type of medium that was potential for the metabolite production and growth of *P. luminescens*. LB, NB, Wakimoto, and T3 were examined as growth media for metabolite production and growth of *P. luminescens*. LB was the best medium for the growth of *P. luminescens* and metabolite production.

KEYWORDS: *Photorhabdus luminescens*, media, exotoxin, toxicity

PENDAHULUAN

Hama merupakan salah satu pembatas produktivitas hasil pertanian. Untuk itu perlu upaya pengendalian, sehingga populasi dan tingkat kerusakan yang ditimbulkan dapat ditekan. Pengendalian hama dengan memanfaatkan musuh alami merupakan salah satu cara yang dapat digunakan, karena selain efektif terhadap hama sasaran, juga tidak menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan.

Photorhabdus luminescens merupakan salah satu bakteri patogen serangga yang potensial untuk digunakan dalam program pengendalian hayati. Keunggulan agen hayati ini ialah selain berkisaran inang luas juga bervirulensi tinggi dengan mematikan serangga dalam waktu 24-48 jam.

Bakteri ini dapat dibiakkan pada media buatan, kompatibel dengan beberapa macam pestisida, dan belum dilaporkan menyebabkan resistensi dan dampak negatif terhadap jasad bukan sasaran seperti mamalia dan vertebrata (Poinar 1990).

Bakteri *P. luminescens* adalah bakteri gram negatif bioluminescens dari famili Enterobacteriaceae (Bowen *et al.* 1998). Bakteri ini bersimbiosis secara mutualistik dengan nematoda patogen serangga (NPS) dari famili Heterorhabditidae. NPS berperan sebagai pembawa bakteri untuk menginfeksi serangga, sedangkan bakteri menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan dan produksi NPS. Bakteri bermultiplikasi dan membunuh serangga dengan cara melepaskan beberapa faktor virulensi (Bowen *et al.* 1998).

Toksin kompleks yang diekskresikan oleh *P. luminescens* dikodekan oleh lokus gen *tca*, *tcb*, *tcc* dan *tcd* sehingga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif bahan transgen yang efektif dan berspektrum luas terhadap serangga.

Berbeda dengan δ -endotoksin yang dikodekan oleh gen *cry* dari bakteri *Bacillus thuringiensis* (Bt), toksisitas eksotoksin yang dihasilkan *P. luminescens* mempunyai spektrum yang lebih luas yang meliputi serangga dari ordo Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera dan Dictyoptera (Bowen *et al.* 1998). Penelitian ini menggunakan serangga *Tenebrio molitor* Lin. (Coleoptera: Tenebrionidae) sebagai serangga model untuk mengetahui efektifitas eksotoksin *P. luminescens* karena mudah diperbanyak pada skala laboratorium. Serangga ini merupakan salah satu hama pasca panen yang merusak benih di tempat penyimpanan.

Potensi eksotoksin *P. luminescens* ini perlu dikembangkan untuk mendukung program pengendalian hayati yang ramah lingkungan. Toksin kompleks merupakan resultan antara tingkat ekspresi gen dengan faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan *P. luminescens*. Pertumbuhan bakteri *P. luminescens* pada media buatan dipengaruhi oleh macam nutrisi yang terkandung dalam media tersebut. Media pertumbuhan dapat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi eksotoksin dari *P. luminescens*. Macam media yang baik dan optimal

untuk pertumbuhan dan produksi eksotoksin belum pernah dilaporkan khususnya untuk *P. luminescens* strain asli Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui macam media yang potensial untuk pertumbuhan dan produksi eksotoksin bakteri *P. luminescens*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian pada tahun 2003.

Pembuatan Standar Pengukuran Konsentrasi Eksotoksin

Standar pengukuran konsentrasi dibuat dengan menggunakan metode Bradford (1976). Standar ini digunakan untuk mengukur konsentrasi ekstrak eksotoksin yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Protein yang digunakan untuk standar adalah Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma). BSA dilarutkan dalam 0,05 M phosphate buffer konsentrasi 0,5 mg/ml dengan pH 7,3.

Penentuan Nilai Absorbansi

Larutan BSA dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi yang berbeda-beda (Tabel 1). Pengenceran dilakukan dengan cara mencampur phosphate buffer dalam tabung eppendorf. Setiap seri pengenceran diukur konsentrasinya dengan spektrofotometer λ_{280} . Selanjutnya, data pengukuran spektrofotometer digunakan untuk menentukan persamaan regresi.

Tabel 1. Konsentrasi larutan BSA pada beberapa seri pengenceran

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Larutan BSA (μl)	Phosphate buffer (μl)
0	0	1000
5	10	990
7,5	15	985
25	50	950
50	100	900
100	200	800
150	300	700

Isolasi dan Preparasi Sumber Inokulum

Bakteri *Photorhabdus luminescens* diisolasi dari ulat hongkong (*Tenebrio molitor*) yang terinfeksi oleh nematoda patogen serangga strain pelabuhan ratu (PLR 4). Isolasi dilakukan dengan media NBTA (nutrient bromthymol blue triphenyltetrazolium chloride agar) untuk mendapatkan koloni bakteri *P. luminescens* fase primer yang mampu menyerap *bromthymol blue* sehingga koloni berwarna biru. Koloni bakteri fase primer tersebut kemudian diperbanyak untuk dijadikan sumber inokulum. Inokulum diperbanyak pada media NB (*nutrient broth*) cair yang diinkubasi selama 24 jam dalam *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada kondisi ruangan (27°C) dengan pH yang tidak terkontrol.

Uji Pertumbuhan Bakteri *P. luminescens*

Pertumbuhan bakteri *P. luminescens* dilakukan pada 4 macam media cair yaitu NB (*beef extract* 1 g, *yeast extract* 2 g, *peptone* 5 g, NaCl 5 g, dan air akuades 1 l), LB (*luria broth*)

(*trypton* 20 g, *yeast extract* 10 g, NaCl 20 g, dan air akuades 1 l), Wakimoto (*potato* 300 g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2 g, *peptone* 5 g, *sucrose* 15 g, dan air akuades 1 l) dan T3 (*trypton* 3 g, *tryptose* 2 g, *yeast extract* 1.5, MnCl_2 0.005 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.9 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.9 g, dan air akuades 1 l). Keempat media cair tersebut, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tiap tabung reaksi diisi sebanyak 5 ml media. Selanjutnya media disumbat dengan kapas dan disterilkan dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah dingin, media diinokulasi dengan 50 μl sel bakteri konsentrasi 10^9 ml/l yang telah berumur 24 jam dari biakan dalam media NB. Selanjutnya biakan diinkubasi dalam *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada kondisi ruangan.

Pertumbuhan bakteri diamati pada 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 42, dan 48 jam setelah inokulasi (jsi) dengan menggunakan spektrofotometer (λ_{560}) (Nealson *et al.* 1990). Nilai absorban

yang diperoleh selanjutnya disubstitusi dalam rumus jumlah sel bakteri *P. luminescens* yang telah dibuat sebelumnya.

Uji pertumbuhan bakteri dilakukan dengan percobaan faktorial dalam rancangan acak lengkap (RAL faktorial). Faktor perlakuan yang diuji terdiri dari 2 faktor, yaitu : 1) perlakuan media dalam 4 taraf, (NB, LB, Wakimoto, T3) dan 2) perlakuan waktu inkubasi dalam 10 taraf, (0, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 42, dan 48 jsi). Data dianalisis ragam dan perbedaan nilai tengah diuji dengan uji jarak berganda Duncan ($\alpha=0,05$) menggunakan program pengolah data SAS ver. 6.12 (SAS Institute, Cary, NC).

Perbanyak Eksotoksin Bakteri *P. luminescens*

Eksotoksin bakteri *P. luminescens* diperbanyak pada 4 macam media cair, yaitu: NB, LB, Wakimoto, dan T3 dalam tabung erlenmeyer 250 ml dan masing-masing tabung diisi 50 ml media tersebut. Media kemudian disterilisasi dalam otoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Media diinokulasi dengan 100 μ l biakan bakteri konsentrasi 10^9 ml/l yang berumur 24 jam dalam media NB. Kemudian biakan diinkubasi selama 48 jam dalam *rotary orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang dan pH yang tidak terkontrol. Percobaan dilakukan dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 ulangan. Data dianalisa sidik ragam dan

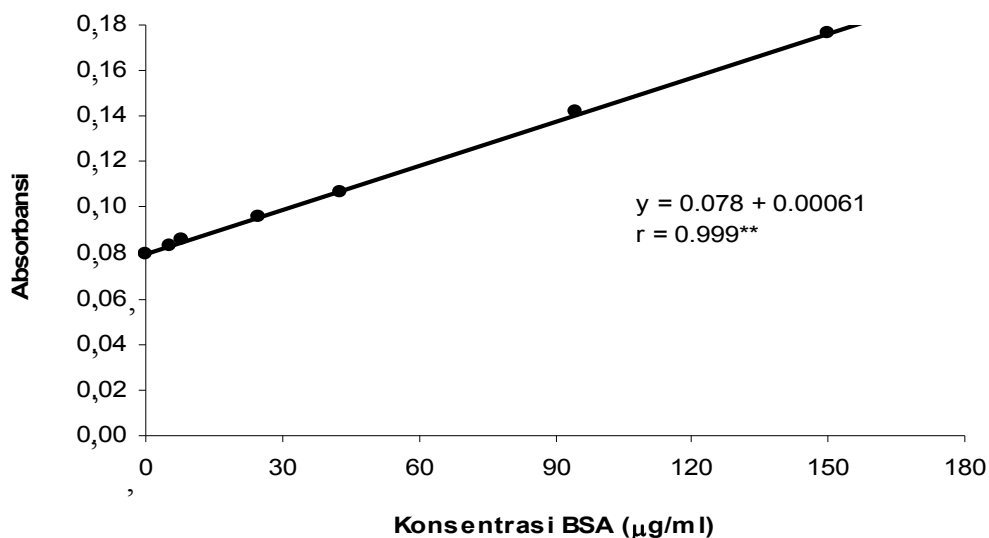
perbedaan nilai tengah diuji dengan uji jarak berganda Duncan ($\alpha = 0,05$) menggunakan program pengolah data SAS ver. 6.12 (SAS Institute, Cary, NC).

Ekstraksi Eksotoksin

Biakan bakteri *P. luminescens* yang telah berumur 48 jam dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi untuk pemisahan sel bakteri dengan ekstrak eksotoksinnya. Biakan disentrifugasi selama 45 menit dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 5°C. Endapan sel bakteri yang ada dibuang, sedangkan supernatannya ditambah PEG-4000 6%. Campuran supernatan dengan PEG diinkubasi selama 24 jam dalam refrigerator sebelum disentrifugasi lagi selama 30 menit dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 5°C. Endapan eksotoksin yang diperoleh dilarutkan dalam phosphate buffer 0,05 M. Ekstrak eksotoksin dalam phosphate buffer disaring dengan kolom DEAE-sephacel dalam buret (volume 10 ml). Setiap 2 ml ekstrak eksotoksin difiltrasi dengan kolom DEAE-sephacel sepanjang 2 cm.

Pengukuran Konsentrasi Eksotoksin

Konsentrasi eksotoksin hasil ekstraksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer (λ_{280}) (Warburg dan Christian, 1941). Sebelum diukur, eksotoksin dihomogenkan dengan vortek. Nilai absorbansinya disubstitusikan dalam rumus/persamaan



Gambar 1. Analisis regresi hubungan antara konsentrasi BSA dengan nilai absorbansi

regresi standar pengukuran konsentrasi eksotoksin yang telah dibuat sebelumnya. Berdasarkan hasil penghitungan ini diperoleh konsentrasi eksotoksin yang sebenarnya.

Uji Toksisitas Eksotoksin

Eksotoksin *P. luminescens* yang didapat dari tahapan ekstraksi kemudian diuji toksisitasnya terhadap larva instar III ulat Hongkong. Uji toksisitas dilakukan dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$. Larva diinjeksi dengan eksotoksin sebanyak 2 $\mu\text{l/larva}$. Injeksi dilakukan dengan menggunakan microsyringe secara intersegmental pada bagian lateral larva. Setiap perlakuan diinjeksi terhadap 15 ekor larva. Sebagai kontrol, larva diinjeksi dengan menggunakan larutan Ringer's. Pengamatan mortalitas larva ulat Hongkong dilakukan setiap hari selama 3 hari. Data dianalisis dengan

program Probit Analysis untuk mendapatkan nilai LT_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Grafik Standar Pengukuran Konsentrasi Eksotoksin

Standar pengukuran konsentrasi eksotoksin dengan menggunakan BSA disajikan dalam Gambar 1. Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi BSA dengan nilai absorbansi mempunyai pola linier. Hubungan kedua parameter tersebut diformulasikan dengan persamaan $Y=0,078+0,00061x$, $r = 0,999$. Artinya, setiap peningkatan konsentrasi BSA diikuti oleh meningkatnya nilai absorbansi. Berdasarkan nilai korelasinya ($r = 0,999$) yang sangat nyata, formulasi tersebut dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi eksotoksin dari sample hasil purifikasi melalui pengukuran nilai

absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer. Misalnya, bila suatu sample mempunyai nilai (Y) atau absorbansi = 0,478, maka konsentrasi eksotoksinnya (x) berdasarkan substitusi nilai tersebut dalam formulasi di atas adalah 655,7 µg/ml.

Pertumbuhan Bakteri *P. luminescens*

Pertumbuhan bakteri secara *in vitro* dipengaruhi oleh kandungan nutrisi, pH media, aerasi serta suhu inkubasi. Kondisi pertumbuhan optimumnya berbeda-beda antar genus, spesies dan strain bakteri. Pertumbuhan bakteri *P. luminescens* telah dipelajari pada media LB, NB, Wakimoto, dan T3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lajur pertumbuhan *P. luminescens* pada keempat macam media tersebut mempunyai pola yang sama, yaitu membentuk kurva sigmoid. Hal ini sesuai dengan pola laju pertumbuhan bakteri pada umumnya. Fase inisiasi terjadi antara 0-2 jsi, kemudian laju pertumbuhannya meningkat tajam hingga 12 jsi. Fase pertumbuhan stasioner terjadi pada 12 jsi.

Dilihat dari jumlah selnya, produksi sel bakteri sangat berbeda nyata antar macam media dan waktu inkubasi. Produksi sel tertinggi sampai dengan 18 jam terjadi pada media LB (9,78 log sel/ml), sedangkan produksi sel terendah pada media T3 (9,449 log sel/ml). Produksi sel pada media NB dan Wakimoto tidak terlalu bervariasi, bahkan pada 30 dan 48 jsi tidak

menunjukkan perbedaan yang nyata (Tabel 2). Laju pertumbuhan dan produksi sel yang tinggi pada media LB diduga karena komposisi media LB lebih disukai untuk pertumbuhan bakteri *P. luminescens* meskipun komposisi medianya tidak sekomplek ketiga media lainnya. Selain itu media LB mengandung trypton dan yeast ekstrak mencapai 5-6 kali kandungan trypton dan yeast ekstrak pada media NB dan T3.

Produksi Eksotoksin Bakteri *P. luminescens*

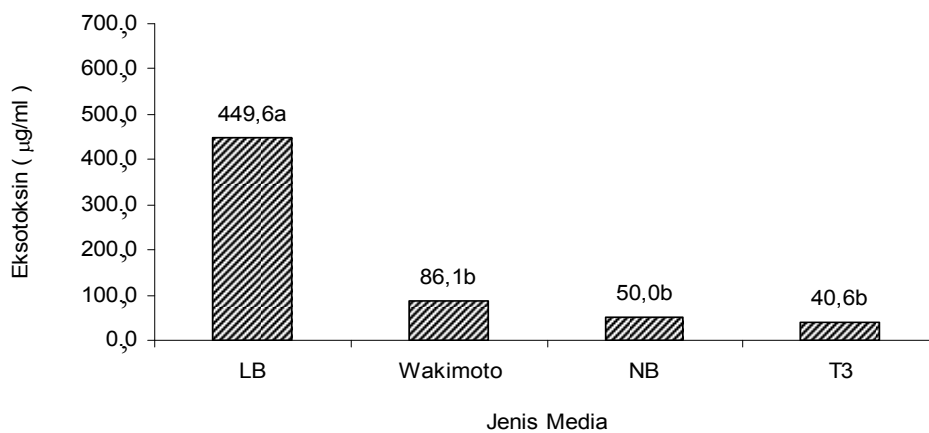
Produksi eksotoksin *P. Luminescens* sangat dipengaruhi oleh macam media yang digunakan untuk perbanyakannya. Sesuai dengan hasil pengamatan laju pertumbuhan dan produksi sel, produksi eksotoksin pada media LB juga paling tinggi, yaitu 449,6 µg/ml, sedangkan pada media wakimoto, NB, dan T3 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (Gambar 2).

Produksi eksotoksin yang tinggi pada media LB diduga bukan hanya disebabkan oleh kandungan trypton dan yeast ekstrak yang tinggi tetapi juga oleh konsentrasi NaCl. Sanders *et al.* (1998) melaporkan bahwa tingkat ekspresi gen penyandi produk metabolit pada bakteri *Lactococcus lactis* dipengaruhi oleh konsentrasi NaCl dalam media. Raihan *et al.* (1992) melaporkan bahwa penambahan NaCl pada media *MacConkey's* agar mampu

Tabel 2. Pengaruh interaksi antara macam media dan waktu inkubasi terhadap produksi bakteri *P. luminescens*

Media	Waktu inkubasi (jam) (log sel/ml)									
	0	2	4	6	12	18	24	30	42	48
LB	8,97 ^{gw}	8,90 ^{hw}	9,08 ^{fx}	9,53 ^{ev}	9,81 ^{dv}	9,78 ^{dv}	9,80 ^{dv}	9,88 ^{bv}	9,93 ^{av}	9,84 ^{cv}
NB	8,65 ^{jx}	8,75 ^{iw}	9,18 ^{hw}	9,40 ^{gx}	9,58 ^{fw}	9,61 ^{ex}	9,66 ^{dw}	9,73 ^{bw}	9,78 ^{ax}	9,69 ^{cw}
WK	9,20 ^{gv}	9,10 ^{hv}	9,28 ^{fv}	9,45 ^{ew}	9,47 ^{ex}	9,65 ^{cw}	9,61 ^{dx}	9,72 ^{bw}	9,82 ^{aw}	9,70 ^{bw}
T3	8,03 ^{iy}	8,17 ^{hy}	8,70 ^{gy}	9,08 ^{fy}	9,45 ^{ey}	9,44 ^{ey}	9,48 ^{dy}	9,59 ^{bx}	9,61 ^{ay}	9,54 ^{cx}

Nilai dalam satu baris dan kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%

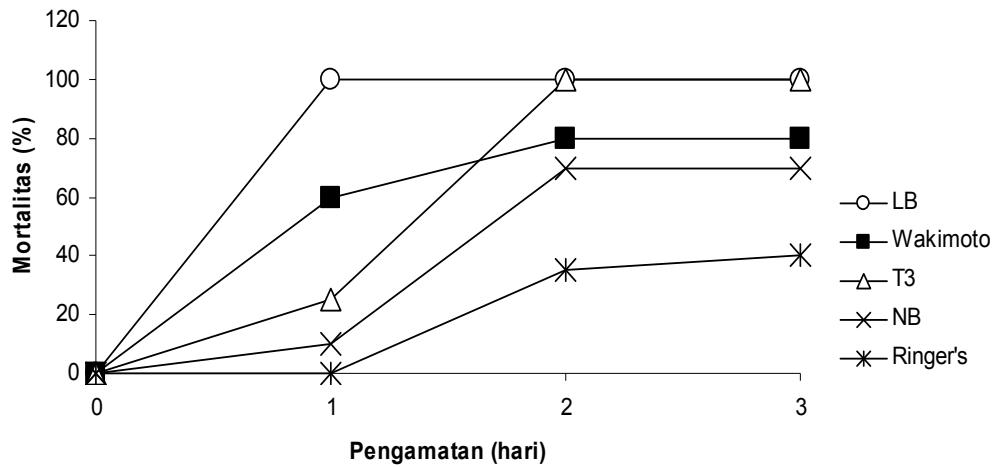


Gambar 2. Produksi eksotoksin *P. luminescens* pada beberapa jenis media

meningkatkan senyawa ekspolisakarida oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Mekanisme pengaruh NaCl dalam meningkatkan produksi eksotoksin diduga berhubungan dengan meningkatnya tekanan osmotik media. Pada kondisi tekanan osmotik eksternal yang tinggi, sekresi metabolit dari dalam sel bakteri akan meningkat, termasuk sekresi eksotoksin. Kemampuan *P. luminescens* dalam beradaptasi pada kondisi NaCl yang tinggi diduga karena berhubungan dengan asal isolat *P. luminescens* yang diisolasi dari daerah pantai yang mem-

punyai tingkat salinitas tinggi. Nealson *et al.* (1990) melaporkan bahwa eksotoksin merupakan salah satu produk metabolit *P. luminescens* yang disekresikan antara pertengahan dan akhir fase pertumbuhan logaritmik. Namun, pendapat lain menyebutkan bahwa eksotoksin disekresikan pada fase pertumbuhan stasioner (Daborn *et al.* 2001). Dengan demikian, berdasarkan laju pertumbuhannya produksi eksotoksin *P. luminescens* pada media NB, LB, Wakimoto, dan T3 dapat dipanen pada umur 6 jsi. Pemanenan pada umur biakan lebih dari 24 jsi dianggap tidak efisien



Gambar 3. Toksisitas eksotoksin yang diproduksi pada beberapa macam media terhadap laju mortalitas ulat Hongkong

Tabel 3. Nilai LT_{50} eksotoksin *P. luminescens* yang diproduksi pada beberapa macam media terhadap ulat Hongkong

Media	Intersep	Kemiringan	LT_{50} (hari)
LB	-	-	tn*
NB	3,82	4,46	1,84
T3	4,59	8,58	1,16
Wakimoto	5,47	0,92	0,31
Ringer's	3,14	3,79	3,10

tn = tidak nyata

* Mortalitas sudah mencapai 100% dalam waktu kurang dari 24 jam setelah injeksi

karena sudah mencapai fase stasioner.

Toksisitas Eksotoksin Bakteri *P. luminescens*

Seperti halnya pengujian toksikologis nematoda patogen serangga dan bakteri *P. luminescens* (Cruickshank *et al.* 1975 Daborn, *et al.* 2002), uji toksisitas eksotoksin bakteri *P. luminescens* juga dilakukan dengan cara injeksi langsung ke dalam tubuh serangga inang. Toksisitas eksotoksin *P. luminescens* yang diekstraksi dari

setiap media cair dari hasil penelitian ini berbeda-beda pengaruhnya terhadap larva ulat Hongkong (*T. molitor*). Hasil analisis waktu yang diperlukan untuk membunuh 50% serangga uji tertera pada Gambar 3 dan Tabel 3.

Toksin yang diproduksi pada media LB toksisitasnya paling tinggi, diikuti oleh media Wakimoto, T3, dan NB. Mortalitas ulat Hongkong oleh eksotoksin dari media LB sudah mencapai 100% dalam waktu kurang

dari 24 jam. Kematian serangga yang disebabkan oleh eksotoksin *P. luminescens* menunjukkan gejala yang khas yaitu warna coklat kemerahan pada tubuh serangga yang mati, sedangkan kematian serangga pada kontrol yang disuntik oleh larutan Ringer's tubuhnya berwarna coklat kehitaman. Garam NaCl dalam media LB diduga tidak saja mampu menstimulasi peningkatan produk eksotoksin tetapi juga toksisitas eksotoksinnya. Namun mekanisme NaCl menstimulasi produksi dan toksisitas eksotoksin *P. Luminescens* masih belum diketahui.

KESIMPULAN

Media LB merupakan media yang mengandung kombinasi media yang sesuai untuk pertumbuhan dan produksi eksotoksin bakteri *P. Luminescens*. Kandungan trypton dan yeast ekstrak yang tinggi diduga menjadi pemicu pertumbuhan dan produksi eksotoksin. Selain kandungan trypton dan yeast ekstrak yang tinggi, kandungan NaCl yang tinggi pada media LB juga menjadi pemicu produksi eksotoksin dan daya toksisitas yang tinggi terhadap larva ulat Hongkong.

DAFTAR PUSTAKA

- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andeev O, Golubeva E, Bhartia R, Ffrench-Constant RH. 1998. Insecticidal toxins from bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280:2129 – 2132.
- Bradford. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cruickshank R, Duguid JP, Marmion BP, Swain RHA. 1975. *Medicinal Microbiology*, Vol II, 12th, edn. Edinburg, Churchill Livingstone. p. 403-404.
- Daborn PJ, Waterfield N, Blight MA, Ffrench-Constant RH. 2001. Measuring Virulence Factor Expression by the Pathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* in Culture and during Insect Infection. *Journal of Bacteriology*, 20(183):5834-5839.
- Daborn PJ, Waterfield N, Blight MA, Ffrench-Constant RH. 2002. A single *Photorhabdus* gene, make caterpillar floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist withn and kill insects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(16):10742-7
- Nealson KH, Schmidt TM, Blekley B. 1990. *Physiology and biochemistry of Xenorhabdus*. Edited by Gaugler R dan Kaya HK), Boca Raton FL: CRC Press. p. 271-284
- Poinar GOJr. 1990. *Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae entomopathogenic nematodes in biological control*. In: Gaugler R, Kaya HK (eds.). CRC Press. Boca Raton, FL. p. 23-61.
- Raihan S, Ahmed N, Ali R, Khan N, Ishaq A. 1992. Production of exopolysaccharide by an indiginous soil isolate. *Journal of*

- Islamic Academy of Sciences*, 5:4, 282-285.
- Sanders JW, Venema G, Kok J, Leenhouts K. 1998. Identification of a sodium chloride-regulated promoter in *Lactococcus lactis* by single-copy chromosomal fusion with a reporter gene. *Mol. Gen. Genet.* 257: 681-685.
- Warburg O, Christian W. 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsfennents Enolase. *Biochem.* 2(310):384-421.
-