

TEKNOLOGI GEN SINTETIK UNTUK PERAKITAN PADI TAHAN HAMA PENGGEREK BATANG

Sri Koerniati

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Padi merupakan tanaman pangan penting di Asia, demikian juga di Eropa Selatan, seperti Perancis dan Spanyol. Padi merupakan tanaman pangan utama di Indonesia, sehingga tingkat produksi padi menjadi sangat penting dalam pertanian Indonesia. Masalah yang menyebabkan penurunan produksi padi menjadi masalah utama yang harus diatasi. Salah satu faktor penyebab penurunan produksi adalah hama penggerek batang lepidoptera, keluarga Pyralidae. Hama ini menyebabkan kehilangan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan serangga hama padi lainnya di Asia, karena sistem penyebaran yang sangat cepat dan pola penyerangannya yang kronis. Serangan hama pada fase vegetatif menyebabkan kerusakan pada anakan, dikenal sebagai sundep. Sedangkan serangan pada fase generatif menyebabkan kerusakan yang menghentikan transportasi nutrisi dari batang ke bulir, terbentuk malai yang sempurna, namun gagal dalam pengisian bulir. Gejala ini dikenal dengan sebutan Beluk. Secara umum kehilangan hasil

yang diakibatkan oleh dua spesies hama penggerek, yakni penggerek batang padi kuning (PBPK) (*Scirpophaga incertulas* Walker) dan penggerek batang padi bergaris (PBPB) (*Chilo suppressalis* Walker) (Ghareyazie *et al.* 1997). Tingkat kehilangan hasil diperkirakan antara 5-20 persen (Ghareyazie *et al.* 1997; Breitler *et al.* 2000). International Rice Research Institute (IRRI) telah melakukan skrining pada 15.000 aksesori plasma nutfah padi untuk sifat ketahanan terhadap PBPK, dan 6000 aksesori padi terhadap PBPB. Sifat ketahanan yang dimiliki oleh aksesori tersebut bervariasi dari rendah ke sedang (Jackson 1995). Sehingga dapat disimpulkan bahwa sifat ketahanan terhadap hama penggerek batang tidak tersedia pada plasma nutfah padi. Atas dasar hal tersebut maka, pendekatan yang dapat digunakan untuk mengatasi hama penggerek batang adalah gen sintetik. Gen sintetik yang banyak digunakan untuk mengatasi hama penggerek batang adalah gen *Cry* atau dikenal dengan sebutan gen *Bt*, berasal dari bakteri *Bacillus thuringiensis*. Gen *Cry* dengan perkembangan genetika rekombinan, genetika engineering dan bioteknologi dapat dimasukkan ke dan menjadi bagian dari genom tanaman padi. Pendekatan dengan gen sintetik *Cry* telah terbukti mampu menimbulkan sifat tahan pada tanaman padi terhadap hama penggerek batang kuning dan penggerek batang bergaris (Wu *et al.* 2000). Pengembangan tanaman tahan hama penggerek dengan menggunakan gen sintetik *Cry*, selain pada padi (Fujimoto *et al.* 1993) adalah pada tanaman jagung (Koziel *et al.* 1993), kapas (Zhu *et al.* 2004), kedelai (Stewart *et al.* 1996a), canola (Stewart *et al.* 1996b) dan tebu (Arencibia, *et al.* 1997). Tanaman hasil rekayasa genetika mengekspresikan protein *Cry* telah diadopsi secara luas di dunia; mencapai 98,5 juta hektar pada tahun 2016 (ISAAA 2016).

Tulisan ini akan menguraikan hal-hal yang berkaitan dengan: (1) sejarah penemuan gen *Cry*; (2) Jenis, pengelompokan, struktur dan fungsi protein (gen) *Cry*; (3) Perkembangan pemanfaatan gen sintetik dalam tanaman; (4) Masalah dan kajian dari pemanfaatan

gen sintetik *Cry* terhadap lingkungan; serta (5) Perkembangan penelitian dan pemanfaatan gen sintetik *Cry* di Indonesia.

SEJARAH PENEMUAN GEN *CRY*

Gen *Bt* pertama kali diketahui ketika seorang biolog Jepang Shigetane Ishiwatan meneliti penyebab penyakit *sotto* (penyakit *suddenly collapse*) yang menyebabkan kematian populasi ulat sutera (*Bombyx mori*) tahun 1901. Dia mengisolasi bakteri *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) sebagai penyebab penyakit tersebut (Bravo *et al.* 2012). Ernst Berliner juga menemukan *Bt* ketika meneliti kematian kupu serangga tepung Mediterania, tahun 1911. Dialah yang menamakan bakteri ini dengan *Bacillus thuringiensis*, nama kota Thuringia, di mana *moth* itu ditemukan. Tahun 1920, petani mulai menggunakan *Bt* sebagai pestisida dan tahun 1938 Perancis mulai memproduksi spora *Bt* untuk skala komersial, dengan nama Sporine, dan penggunaan utamanya untuk serangga *moth* pada tepung. Faktor penghambat dari penggunaan produk spora ini adalah mudah tercuci air hujan, sehingga pemanfaatannya sebagai pestisida tidak efektif (http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html).

Sejak awal telah diketahui bahwa *Bt* hanya membunuh spesies serangga khusus, seperti larva lepidoptera. Pada tahun 1956, tiga peneliti German (Hannay, Frizt-James dan Angus) menemukan aktivitas insektisidal dari *Bt* terhadap serangga lepidoptera, yaitu kristal *parasporal* (http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html). *Bt* dikomersialkan di Amerika pada tahun 1958 dan tahun 1961 terdaftar sebagai pestisida di EPA. Hingga tahun 1977 hanya 13 strain *Bt* yang telah diketahui, dan seluruhnya bersifat racun hanya terhadap larva spesies lepidoptera. Kemudian diketahui ada strain *Bt* yang bersifat racun terhadap larva serangga subspecies Diptera (lalat), dan di tahun 1983 ditemukan strain *Bt*

yang bersifat racun terhadap serangga spesies coleoptera (lebah) (http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html).

Pada tahun 80-an, penggunaan biopestisida *Bt* meningkat lagi, akibat dari terjadinya resistensi pada serangga hama terhadap pestisida buatan. Biopestisida *Bt* dipandang ramah lingkungan karena presistensinya yang rendah (Bravo *et al.* 2013). Atas dasar tersebut, maka penelitian tentang gen *Bt* yang mengkode pembentukan kristal toksin mulai didanai oleh pemerintah dan industri pestisida di Amerika. Keberhasilan penggunaan *Bt* sebagai biopestisida sejalan dengan pengembangan tanaman *Bt* yang mengekspresikan gen *Cry*, menghasilkan tanaman tahan terhadap serangga, termasuk hama penggerek yang sulit diatasi. Tanaman *Bt* mulai dikomersialkan pada tahun 1995 (Bravo *et al.* 2013).

JENIS, PENGELOMPOKAN, STRUKTUR DAN FUNGSI PROTEIN (GEN) *CRY*

Bacillus thuringiensis atau *Bt* dapat ditemukan di mana saja. Survei menunjukkan bahwa bakteri tanah gram positif ini menyebar dalam jumlah sedikit, namun tersebar secara luas. Faktor penentu dari kemampuan insektisidal dari bakteri *Bt* adalah *alpha-endotoxin* yang dihasilkan pada saat bakteri membentuk spora (sporulasi), membentuk 2 grup multigenik, *cry* dan *cyt* (de Maagd *et al.* 2001). Protein *Cry* spesifik bersifat racun untuk serangga dengan ordo berlainan, antara lain Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera dan Diptera. Sedangkan *Cyt* bersifat racun untuk Diptera dan dengan pengecualian beberapa Lepidoptera (de Maagd *et al.* 2001).

Di antara banyaknya strain *Bt* yang ditemukan, *strain* yang umum digunakan sebagai insektisida berasal dari subspecies *Kurstaki* (Gill *et al.* 1995). Pengklasifikasian protein *Cry* untuk pertama kali dilakukan oleh Hofte and Whitely pada tahun 1989

(Crickmore *et al.* 1998). Pengklasifikasiannya berdasarkan toksisitas. Protein *Cry* terbagi ke dalam 4 kelompok yaitu *CryI* (spesifik terhadap Lepidoptera), *CryII* (Lepidoptera dan spesifik Diptera), *CryIII* (spesifik terhadap Coleoptera) dan *CryIV* (spesifik terhadap Diptera). Beberapa peneliti yang bekerja dengan toksin *Bt* menjumpai *overlapping* dengan sistem pengelompokan tersebut.

Crickmore *et al.* (1998) mengusulkan sistem penamaan berdasarkan sekuen Asam Amino (AA), dimana setiap gen *Cry* ditandai dengan kode 4 dan menghasilkan sekitar 70 kelompok gen *Cry* yang berbeda yakni *Cry1*, *Cry2*, dan seterusnya hingga *Cry70*. Toksin yang dimiliki oleh tiap kelompok *Cry* memiliki kesamaan AA 45%. Dalam setiap kelompok, huruf besar dalam tiap kelompok (*Cry1A*, *Cry1B*) diberikan kepada toksin *Cry* yang memiliki kesamaan AA lebih kecil dari 70%. Sedangkan huruf kecil misal *Cry1Aa* dan *Cry1Ab* diberikan ketika toksin memiliki kesamaan AA lebih besar dari 70% tapi lebih kecil dari 95%. Komisi *advisory* untuk penamaan gen *Cry* telah dibentuk dan alamat *website* dari komisi ini adalah http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/B.thuringiensis/. Sistem pengelompokan yang baru diharapkan dapat mengakomodasi jumlah sekuen baru yang lebih banyak. Crickmore *et al.* (2011) melaporkan lebih dari 700 gen *Cry* telah dapat diidentifikasi.

Kegiatan karakterisasi protein kristal gen *Cry* telah dilakukan oleh peneliti di berbagai negara, tujuannya dapat menemukan *holotype* gen *Cry* yang baru. Satu di antaranya dilaporkan oleh Zhu *et al.* (2009) yang menskrining 791 isolat *B. thuringiensis* dari 2650 sampel tanah berasal dari lembah Sichuan, mereka menemukan *strain Cry1*, *Cry2*, *Cry3*, *Cry4*, *Cry9*, dan *Cry40* dengan menggunakan metode; (SEM, PCR-RFLP, SDS-PAGE, dan toksisitas). Hasilnya *strain* yang mengandung gen *Cry1* adalah yang paling banyak ditemukan (66%), 21 dengan gen *Cry1* dan kombinasi, dan beberapa holotipe gen *Cry* yang baru. Dari penelitian ini telah ditemukan 3 gen *Cry* yang baru, dinamai dengan

Cry54Aa1, *Cry30Fa1* dan *Cry30Ga1*. Selanjutnya dari 791 isolat *Bt* tersebut menghasilkan informasi bahwa 322 isolat membawa gen kombinasi *Cry2Aa/Cry2Ab*, *Cry2Aa*, atau *Cry2Ab* dan 1 isolat (JF19-2) mengandung gen *Cry* baru dinamai *Cry2Ag1* (Genbank ACH91610). Uji toksisitas menunjukkan bahwa gen *Cry2Ag1* memiliki aktifitas toksisitas paling tinggi (Liang *et al.* 1995).

Bravo *et al.* (2013) melaporkan bahwa kelompok *Cry-3D domain* merupakan karakterisasi yang lebih tepat, berkaitan dengan evolusi alaminya gen yang mengarah pada jumlah besar protein *Cry* dengan struktur yang sama, cara kerja, tetapi berbeda kekhususan serangganya. Struktur toksin *Cry3-domain* (*Cry-3D*) terdiri dari *domain* I yang dibentuk dari 7 α helices, berperan untuk insersi ke dalam membran pencernaan (*gut*) dan membentuk pori, *domain* II yang nampak seperti kolom segitiga dari anti paralel *beta-sheets*, berfungsi untuk penempelan ke reseptor pada bagian lapisan *epithelium* dari pencernaan serangga bagian tengah (*midgut*), serta *domain* III terdiri dari anti paralel pita β dalam bentuk β -sandwich namun fungsinya masih belum diketahui. Cara bekerja dari toksin *Cry-3D* melibatkan interaksi yang berurutan dengan beberapa protein pencernaan serangga, yang memfasilitasi terbentuknya struktur oligomerik dan menginduksi insersi toksin ke dalam membran, kemudian membentuk pori yang mematikan sel-sel saluran pencernaan di bagian tengah (*midguts*). Toksin *Cry-3D* ini bekerjanya sangat spesifik terhadap serangga targetnya, dan hanya mematikan sejumlah kecil spesies, sehingga sangat aman untuk manusia, hewan vertebrata dan tanaman, serta terdegradasi secara alami. Struktur *Cry-3D* ini ketika diekspresikan di tanaman transgenik akan berkontribusi pada pengendalian hama secara efisien, dan berkontribusi pada pengurangan penggunaan pestisida kimia (Bravo *et al.* 2013).

Kelompok protein *Cry-3D (domain)* dicirikan oleh protein yang diproduksi saat sporulasi yaitu protoksin, sebesar 130 kD, misal protoksin *Cry1Aa*. Protoksin ini akan diproses (dirubah) oleh

protease pada saluran pencernaan bagian tengah (*midgut*) serangga, sehingga hilang separuh dari protein (sekitar 600 AA) pada *C-terminal*. Protoksin yang besar juga akan diproses di *domain N-terminal*, sehingga mengalami pengurangan sekitar 20–50 AA residu. Sedangkan protoksin yang pendek hanya akan di proses di *domain N-terminal* (de Maagd *et al.* 2001). Kristal *Cry1A* yang berbentuk bipiramidal, dibentuk oleh protoksin yang berukuran 130-140 kDa. Protein ini akan larut pada pH tinggi (>9) dan menghasilkan toksin sekitar 70kDa setelah mengalami *trypsinization*, satu diantaranya adalah *Cry1Ab* (Bravo *et al.* 2013).

Vasquez-Padron *et al.* (2004) melaporkan bahwa protoksin *Cry1Ab* terdiri dari 2 bagian yaitu toksin *N-terminal* dan *C-terminal*, dimana keduanya tidak berperan terpisah, namun saling melengkapi. *C-terminal* berkaitan dengan toksisitas, berperan dalam pembentukan kristal dan juga kelarutan dari toksin. Namun yang menarik adalah fusi antara *C-terminal* dengan domain III atau seluruh bagian *N-terminal* dapat mengurangi atau menetralkan efek dari toksin, sedangkan peptida non-*Cry1A* misalnya *protein binding maltose* tidak dapat menetralkan efek toksin. Toksin *C-terminal* yang kaya akan Cystein merupakan bagian yang sangat terkonservasi diantara protein-protein *Cry*. Mutasi pada sekuen bagian *C-terminal* dari protoksin *Cry1Ab* dapat mempengaruhi kelarutannya (Wabiko & Yasuda 1995). Selain itu toksin hanya dapat larut pada kondisi pH tinggi, kondisi yang umum pada *midgut* serangga lepidoptera (Vazquez-Padron 2000).

Gomes *et al.* (2014) melaporkan tentang dua oligomer *pre-pore* dari toksin *Cry1Ab* terbentuk sebelum insersi membran. Oligomer terbentuk sesudah penempelan protoksin atau toksin yang telah diaktivasi oleh *protease* ke reseptor *cadherin*. Ke dua *pre-pore* memiliki karakteristik yang berbeda dan berkontribusi pada aktivitas *insektisidal* (Gomes *et al.* 2014). Jenis toksin seperti ini sangat diminati karena sangat efisien dan aman. Tetapi baru

beberapa strain *Bt* yang telah digunakan untuk pembuatan bio-insektisida semprot, yaitu hanya sekitar 2% dari total keseluruhan insektisida yang beredar. Beberapa gen *Cry* telah diintroduksi ke tanaman transgenik, dan pendekatan ini telah menyediakan cara yang sangat efektif untuk mengendalikan serangan hama pertanian, dan menurunkan penggunaan pestisida kimia di lapangan serta sekaligus menurunkan pencemaran lingkungan (James 2010).

Perkembangan pemanfaatan gen sintetik cry dalam tanaman

Penelitian memanfaatkan gen *Cry* pada tanaman telah membuktikan bahwa protein *Cry* sangat efektif untuk menanggulangi hama penggerek batang dan bekerja sangat spesifik terhadap hama target. Penggunaan gen *Cry* tidak membahayakan bagi manusia atau organisme lain. Sehingga penggunaannya akan memberikan dampak yang nyata pada penurunan kehilangan hasil pertanian akibat serangan serangga hama dan sekaligus akan menurunkan tingkat pencemaran lingkungan (Bravo *et al.* 2013). Komersialisasi tanaman *Bt* pertama kali dilakukan pada tahun 1995. Di tahun 2010 lebih dari 58 juta ha tanaman jagung-*Bt* dan kapas *Bt* telah ditanam di berbagai negara di dunia, (James 2010).

Kemajuan yang dicapai tidak terlepas dari upaya awal untuk mengumpulkan isolate *Bt* dan mengkarakterisasi protein *Cry* dengan berbagai metoda (mikroskopi, SEM, PCR-RFLP, SDS-PAGE, sekuensing dan aktifitas insektisidal), serta upaya untuk mengkloning gen *Cry* (Pardo-Lopez *et al.* 2013) (Bravo *et al.* 2013) Protein *Cry* diketahui tidak bertahan dengan UV, mudah tercuci oleh hujan dan mudah terdegradasi bila diaplikasi sebagai biopestisida. Sehingga pembuatan tanaman transgenik adalah upaya agar efektivitasnya terjamin dan efisien.

Upaya pertama untuk mengkonstruksi 1974 bp gen sintetik dari sintesis oligonukleotida secara kimia, dilakukan untuk tujuan memperbaiki ekspresi protein *Cry3A* dari *B.thurungiensis* var. *tenebrionis* dalam transgenik tembakau (Sutton *et al.* 1992). Pada pelaksanaannya dijumpai kesulitan untuk dapat mengekspresikan gen toksin *Cry* dalam tanaman, walaupun dikontrol dengan promoter tanaman yang efisien. Sehingga dilakukanlah upaya menganalisa dan mengurangi 5 grup sekuen yang dijumpai pada seluruh bagian gen *Cry3A* yang menyerupai prosesing signal eukariotik. Bagian tersebut kemungkinan bertanggung jawab pada rendahnya tingkat transkripsi dan translasi. Selanjutnya kandungan GC ditingkatkan dari 36% ke 49% dan penggunaan kodon (*codon*) dirubah menjadi lebih mirip kodon tanaman. Ketika gen sintetik ditempatkan sesudah promoter CaMV 35S, maka terbentuklah protein sebesar 0,6%. Bioasai menggunakan larva kumbang kentang dilakukan untuk membuktikan adanya protein yang terbentuk. Hasilnya menunjukkan bahwa protein *Cry3A* terbentuk, karena mampu mengendalikan serangga hama kumbang kentang tersebut (Sutton *et al.* 1992)

Guna mengoptimalkan ekspresi, maka dilakukan upaya untuk merekonstruksi gen *Cry3A*. Gen *Cry3A* yang berukuran 1,8kb (disintesa dengan menggunakan 3 pasang oligonukleotida), telah dimodifikasi untuk memiliki pola pemakaian kodon tanaman Dikotil dan tidak memiliki nukleotida yang kaya AT (Adang *et al.* 1993). Upaya ini menghasilkan 58 (dari 63) lini transgenik kentang yang memiliki sifat tahan terhadap instar1 hama kumbang kentang Colorado (CPB). Tingkat ekspresi protein *Cry* yang dihasilkan adalah 0,025 hingga 0,1% (Adang *et al.* 1993).

Stewart *et al.* (1996) melaporkan penggunaan gen sintetik *cry1Ac* pada tanaman canola. Gen *Cry1Ac* yang lebih pendek (*truncated*) dibawah kontrol 35S promoter telah ditransformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*, menghasilkan 57 lini transgenik yang memiliki 1-12 salinan T-DNA. Tingkat ekspresi

protein *Cry1Ac* antara 0 hingga 0,4%, dan dapat mengendalikan *Plutella xylostella* L.

Yang dimaksud dengan gen *truncated*, adalah menghilangkan bagian yang akan menyebabkan terjadinya penghentian transkripsi atau translasi lebih awal, yakni bagian putatif signal polyadenylation (Khumar *et al.* 2004). Tingkat ekspresi 0,4% ini adalah yang tinggi di antara yang dihasilkan pada penelitian-penelitian sebelumnya, yaitu 0,03% protein *cry1Ab* pada tembakau (Perlak *et al.* 1993), 0,05% *cry1Ab* pada padi (Fujimoto *et al.* 1993) dan 0,4% *cry1Ab* pada jagung (Kozziel *et al.*, 1993). Pengujian transgenik kedelai yang mengekspresikan protein *Cry* (dari gen *cry1Ac*) sampai dengan 46 ng/mg total protein yang diekstrak dapat melindungi tanaman tersebut dari serangan ulat *Helicoverpa zea*, ulat loncat kedelai *Pseudoplusia includens*, ulat tembakau (*heliotis virescens*) (Stewart *et al.* 1996).

Sardana *et al.* (1996) telah melakukan modifikasi dan menghasilkan gen sintetik *cry1Ab* dan *cry1Ac*, masing-masing berukuran 1845bp. Kedua gen ini dikontrol dengan promoter ubiquitin, dan telah diuji dengan kultur sel suspensi endosperm jagung. Nayak *et al.* (1997) melakukan konstruksi sintetik gen *Cry1Ac* dengan cara mensintesa gen dengan 6 fragmen yang kecil menggunakan primer yang berukuran 80-100 bp diikuti dengan metoda *Recursive* PCR. Masing-masing DNA dikloning ke plasmid pUC18, disekuen sebelum diligasi pada beberapa restriksi untuk menghasikan fragmen yang panjang. Kodon di sekeliling kodon inisiasi disesuaikan dengan kodon tanaman. Promoter jagung *Ubiquitin1*, intron pertama dari gen *Ubiquitin1* dan gen terminator *Nopaline synthetase* difusikan dengan gen *cry1Ac* yang telah dimodifikasi. Upaya ini menghasilkan tanaman padi bersifat sangat toksik terhadap serangga hama penggerek batang padi kuning (PBPK) (Nayak *et al.*, 1997). Arencibia *et al.* (1997) mengisolasi fragmen DNA gen *cry1Ab* (2,1 kb) dari total DNA bakteri *B. Thuringiensis* vad. *Kustaki* HD-1, diinser ke

pUC19. Selanjutnya diklon ke plasmid, di antara gen promoter 35S dan terminator tNos, menghasilkan plasmid pBPFQ4. Plasmid pBI 221.1 dipergunakan sebagai plasmid seleksi pada *co*-transformasi. Walaupun gen yang diekspresikan bukan gen yang telah dimodifikasi, namun ternyata mampu menimbulkan sifat ketahanan pada lini transgenik tebu terhadap hama penggerek batang tebu (*Diatraea saccharalis* F.).

Sejumlah 2600 lini padi transgenik *CryIAb* dan *CryIAc* telah dihasilkan oleh Cheng *et al.* (1998), menggunakan konstruksi yang dibuat oleh Sardana *et al.* (1996). Bioasai telah dilakukan terhadap hama penggerek batang Kuning dan penggerek batang bergaris. Hasilnya lini padi transgenik menunjukkan sifat ketahanan yang tinggi dan menyebabkan mortalitas larva target yang tinggi (Cheng *et al.* 1998).

Manfaat dan keuntungan dari penggunaan gen *Cry* untuk mengatasi hama telah didokumentasi dengan baik pada tanaman kapas *Bt* di India. Penggunaan kapas transgenik mampu menurunkan penggunaan pestisida hingga 70%, menurunkan biaya produksi dan meningkatkan produksi kapas 70 hingga 80% (Qaim & Zilberman 2003).

MASALAH DAN KAJIAN DARI PEMANFAATAN GEN SINTETIK *CRY* TERHADAP LINGKUNGAN

Walaupun manfaat dan keunggulan dari tanaman yang mengekspresikan gen sintetik *Cry*, telah diakui, namun kekhawatiran publik akan tanaman hasil rekayasa genetik ini cukup besar, hal ini karena informasi yang berkaitan dengan gen *Cry*, tentang cara bekerjanya gen tersebut terhadap hama target, dan faktor-faktor pembatas bagi penyebaran gen tersebut ke alam, tidak diketahui oleh publik.

Dengan berkembangnya penelitian maka output berupa tanaman hasil rekayasa genetik telah mulai bisa dinikmati. Padi

tahan penggerek batang telah mulai dikomersialisasikan di Cina sejak tahun 2009. Hasil penelitian yang mengkaji dan menunjukkan bahwa tanaman yang mengandung gen sintetik *Cry* adalah aman, bahkan kadang lebih aman dibandingkan dengan tanaman nontransgenik. Gao *et al.* (2010), melaporkan tentang potensi pengaruh kumulatif jangka panjang dari tanaman transgenik padi *Bt* (*Cry1Ab*) pada organisma nontarget dan parasitoid yang diobservasi pada beberapa generasi. Hasil menunjukkan bahwa protein *Cry1Ab* dapat dideteksi pada parasitoid *Anagrus nilaparvatae* yang baru keluar, namun tidak nampak pengaruh yang nyata pada kesuburan dan pada sex rasionya. Sex ratio diamati pada 11 generasi *Anagrus nilaparvatae*.

Tian *et al.* (2010) melaporkan hasil penelitian tentang pengaruh padi *Bt* TT9 dan KMD1 (yang masing-masing mengekspresikan gen *Cry1Ab/Cry1Ac* dan *Cry1Ab*) terhadap serangga nontarget dan musuh alami, yaitu predator laba-laba tanah (*Ummeliata insecticeps*) yang diberi umpan dengan wereng (*Nilaparvata lugens*) yang memakan padi *Bt*. Uji immuno menunjukkan bahwa *U. insecticeps* memakan protein *cry*, namun tidak ada pengaruh negatif pada daya tahan hidup dan perkembangannya. Pengamatan uji lapang dilakukan selama 3 tahun berturut-turut menunjukkan hasil tidak ada dampak yang nyata terhadap daya tahan hidup, waktu pertumbuhan, kesuburan dan kepadatan populasi *U. insecticeps* baik di laboratorium maupun di lapangan.

Kajian lainnya yang dilakukan adalah dampak padi transgenik *Cry1Ab* terhadap kesehatan, ekologi dan daya predasi laba-laba. Poin penting yang sering muncul dalam debat adalah keselamatan ekologi dari serangga non-target akibat penanaman padi *Bt*. Tian *et al.* (2012) melaporkan bahwa tidak ada pengaruh antara diberi makan padi *Bt* dan padi non *Bt* terhadap daya tahan hidup, kesuburan dan populasi laba-laba. ELISA dan analisa PCR saluran pencernaan (*gut*) menunjukkan bahwa tidak ada per-

bedaan predasi dari *Pseudo annualata* di lahan pertanian padi *Bt* dan padi non *Bt*. Penelitian ini menunjukkan bahwa komersialisasi padi transgenik *Bt* di lapang tidak membahayakan predator yang penting tersebut. Hasil-hasil penelitian ini Tian *et al.* (2010 dan 2012) sangat penting untuk mendukung komersialisasi padi transgenik *Cry* yang telah mendapat ijin dari pemerintah Cina sejak tahun 2009.

Pengembangan galur padi dengan gen toksin *Cry* telah mengalami kemajuan yang cepat dengan dikeluarkannya *biosafety* untuk ke 2 galur padi *Bt* pada tahun 2009 di Cina. Studi mengkonfirmasi bahwa padi *Bt* sama amannya dengan padi non-*Bt* terhadap organisme non-target, apabila tidak dilakukan penyemprotan pestisida. Akan tetapi, apabila pestisida masih diperlukan dalam mengontrol hama, maka hasilnya menunjukkan padi *Bt* lebih aman dibandingkan dengan padi non-*Bt* (Li *et al.* 2014). Pada studi ini zooplankton dipergunakan sebagai indikator. Dari keseluruhan waktu tanam, padi *Bt* hanya memerlukan 2 kali penyemprotan, sedangkan padi non-*Bt* memerlukan 5× penyemprotan. Hasil Analisa laboratorium menunjukkan air sawah yang ditanami padi non *Bt* memiliki residu lebih tinggi, sehingga kurang baik untuk daya tahan hidup dan reproduksi *Daphnia magna* dan *Paramecium caudatum* (zooplankton) dibandingkan dengan air sawah yang ditanami padi *Bt*. Kesimpulan studi bahwa padi *Bt* lebih aman untuk lingkungan ekosistem air, sehingga komersialisasi padi *Bt* akan menguntungkan untuk mempertahankan biodiversitas ekosistem yang berbasis padi.

PROSPEK DAN PEMANFAATAN GEN SINTETIK DI INDONESIA: PROSPEK DAN KENDALA?

Permanfaatan gen sintetis *Cry* untuk menanggulangi serangan hama pernggerek batang di Indonesia telah dimulai sejak tahun 2000-an. LIPI mengembangkan padi tahan penggerek dengan

mengekspresikan gen fusi *cry1B* dan *cry1Aa* pada padi Rojolele (Rahmawati & Slamet-Loedin 2005), *cry1B* yang didrive oleh gen promoter *mpi* dan *cry1Ab* hasil *particle bombardment* (Usyati *et al.* 2009). Lima lini telah diuji terhadap PBPK, satu galur (6.11) memiliki sifat sangat resisten (skala 0) dan 2 lini (4.2.4 dan 3R7) memiliki sifat resistan (skala 1) dan dua lainnya bersifat sedang (*moderat resistance*) (skala 3) (Usyati *et al.* 2009).

BB Biogen telah mulai mengembangkan padi tahan pengerek dengan *cry1Ab* dan *cry1Ac* (Hanarida *et al.* 2000). Namun galur yang terbentuk belum menunjukkan sifat sangat tahan terhadap PBPK. Selanjutnya Koerniati dan Trijatmiko (2018) telah melaporkan upaya mengekspresikan gen fusi *cry1Ab* dan *cry1Ac* dengan diregulasi oleh gen promoter yang spesifik di kloroplas (*Rubisco*) pada padi varietas Inpari6 dan Ciherang. Bioasai sebanyak 23 lini padi transgenik terhadap PBPK, menghasilkan 5 nomor (Incry 1, 2, 11, 18 dan Incry 25) yang bersifat tahan (skala 1) sampai sedang (skala 3).

Penggunaan fusi dua gen *cry* dalam satu tanaman transgenik padi tahan hama dan juga area yang ditanami dengan tanaman padi non transgenik (*refuge*) sangat dianjurkan untuk pengelolaan resistensi hama terhadap tanaman transgenik (Cohen *et al.* 2000). Fusi dua gen *cry* dapat meningkatkan dosis protein Bt, sehingga akan memperlambat patahnya sifat tahan tanaman (Cohen *et al.* 2000). Penggunaan gen *cry* yang memiliki perbedaan mekanisme kerjanya sangat dianjurkan pada pengembangan jagung dan kapas Bt (Adamson, 2002 dalam Bahagiawati 2011).

Selain itu, Cohen *et al.* (2000) melaporkan tentang perlunya lahan yang ditanami tanaman non transgenik (*refuge*) disekitar pertanian transgenik untuk menghindari terjadinya resistensi pada hama target akibat beradaptasi dengan protein Bt. Penanaman padi non-transgenik sebagai *refuge* disekitar padi transgenik tahan hama, akan menimbulkan keseimbangan ekosistem dan mencegah terjadinya patah resistensi dari tanaman

transgenik. Seandainya terdapat serangga yang mengalami perubahan sifat menjadi tahan terhadap racun *Cry* yang dihasilkan oleh tanaman transgenik, serangga ini akan tetap bisa terkontrol karena tetap bisa melakukan kopulasi dengan serangga yang tidak tahan, sehingga serangga yang homosigot resistan tidak terbentuk atau lambat terbentuk (Cohen *et al.* 2000). Besaran atau luas lahan *refuge* (non Bt) pada penanaman jagung Bt di Amerika Serikat adalah 20% dari luas areal tanaman jagung Bt. Namun penerapan *refuge* agak sulit dilakukan di negara berkembang, karena pada umumnya petani memiliki lahan pertanian yang sempit.

Kaitannya dengan pengembangan padi transgenik *Cry* untuk mengendalikan hama penggerek batang, maka perlu dilakukan penelitian untuk menetapkan besaran lahan *refuge* untuk budi daya tanaman padi transgenik *cry* di Indonesia (Bahagiawati 2011). Upaya pengembangan tanaman transgenik padi menggunakan beberapa gen sintesis *cry* dan penerapan *refuge* akan secara langsung mengendalikan perkembangan hama penggerek dan akan dapat melestarikan ekosistem di lahan pertanian padi. Penanaman tanaman budi daya *Bt* dalam skala luas akan dapat meningkatkan populasi serangga non-target dan predator, karena penurunan aplikasi pestisida pada transgenik *Bt* (Lu *et al.* 2012; Naranjo 2011).

Kendala lainnya bagi pengembangan tanaman transgenik, termasuk tanaman padi *Cry*, di Indonesia adalah belum adanya peraturan pemerintah yang meregulasi pengawasan dan pengendalian penanaman produk rekayasa genetik (PRG) di lapang. Sehingga tanaman PRG belum dapat dibudi dayakan secara bebas di Indonesia.

KESIMPULAN

Penggunaan tanaman transgenik padi dengan dua gen *Cry* dengan *mode of action* yang berbeda dan *areal refuge* jika diterapkan pada budi daya tanaman padi transgenik akan akan memperlambat berkembangnya hama target yang homosigot resistan (RR) Namun luas areal refuge yang diaplikasikan perlu diteliti untuk tiap daerah pengembangan tanaman transgenik Bt, termasuk untuk area budi daya padi di Indonesia. Penggunaan varietas tanaman transgenik Bt, khususnya padi Bt di Cina sejak tahun 2009, telah meningkatkan produksi sebanyak 8% dan mengurangi penggunaan pestisida sebanyak 80%. Penelitian pengembangan tanaman transgenik padi *Cry* telah dilakukan di Indonesia. Beberapa galur yang bersifat tahan dan sedang terhadap hama penggerek batang padi telah mulai dihasilkan dan dalam tahap pengujian. Kontribusi tanaman PRG bagi pertanian dapat dirasakan manfaatnya apabila tersedia peraturan pemerintah yang mendukung pengembangan PRG di wilayah negara tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. *Bacillus thuringiensis*. http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html.
- Arencibia A, Vazquez RI, Prieto D, Pilar Téllez P, Carmona ER, Coego A, Hernández L, De la Riva G, Selman-Housein G, 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Mol Breed*. 3:247-255.
- Bahagiawati. 2011. Plot refugium untuk pengelolaan resistensi hama terhadap tanaman transgenik Bt. *J AgroBiogen* 7:128-137.

- Breitler JC, Marfà V, Royer M, Meynard D, Vassal JM, Vercambre B, Guiderdoni E. 2000. Expression of a *Bacillus thuringiensis cry1B* synthetic gene protects Mediterranean rice against the striped stem borer. *Plant Cell Reports*. 19:1195-1202. <https://doi.org/10.1007/s002990000247>
- Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis Cry* toxins insecticidal activity. *Microb Biotechnol*. 6:17-26. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x
- Cheng X, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I. 1998. Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:2767-2772.
- Cohen MB, Gould F, Bentur JS. 2000. Bt rice practical steps to sustainable use. In. *Rice Res. Notes*. 25:4-10.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:807-813.
- Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. 2018. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" <http://www.btnomenclature.info/>.
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001 How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*. 17:193-199. doi: 10.1016/S0168-9525(01)02237-5.
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyozuka J, Shi-mamoto K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology*. 11:1151-1155.

- Gao MQ, Hou SP, Pu DQ, Shi M, Ye GY, Chen XX. 2010. Multi-generation effects of Bt rice on *Anagrus nilaparvatae*, a parasitoid of the nontarget pest *Nilaparvata lugens*. *Environ Entomol.* 39:2039-2044. doi: 10.1603/EN10035.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, de Palma JM, Liwanag EA, Cohen MB, Khush GS, Bennett J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a Synthetic *cryIA(b)* gene. *Mol Breed.* 3:401-414. Kluwer academic Publisher.
- Gill SS, Cowles EA, Francis V. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* *CryIAC* toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J Biol Chem.* 270:27277-27282.
- Gómez IG, Sánchez JS, Munoz-Garay C, Matus V, Gill SS, Sobéron M, Bravo A. 2014. *Bacillus thuringiensis* *Cry1A* toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. *Biochem J.* 459:383-396. doi: 10.1042/BJ20131408.
- Hanarida I, Apriana A, Dewi IS, Listanto E, Ambarwati AD, Santoso TJ. 2000. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman.
- ISAAA C. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief No. 52. Ithaca (USA): International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jackson M. 1995. Enhancing insect resistance in rice through Biotechnology. In: Carozzi N, Koziel M, editors. *Advances In Insect Control: The Role Of Transgenic Plants*. London (UK): Taylor and Francis Ltd. p. 90.

- James C. 2010. A global overview of Biotech (GM) crops: adoption, impact and future prospects. *GM Crops*: vol 1. issue 1.
- Li G, Wan Y, Liu B, Zhang G. 2014. Transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) rice is safer to aquatic ecosystems than its non-transgenic counterpart. *PLoS One*. 9(8): e104270. doi: 10.1371/journal.pone.0104270.
- Liang H, Liu Y, Zhu J, Peng G, Li S, Wang S, Zheng A, Liu H, Li P. 1995. Characterization of *Cry2*-Type Genes of *Bacillus Thuringiensis* Strains from Soil isolated of Sichuan Basin, China. *Microbiology*. 141:629-39.
- Lu Y, Wu K, Jiang Y, Guo Y, Desneux N. 2012. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*. 487:362-365.
- Mureithi JM, Waturu CN, Matiru VN, Mbogori M, Wepukhulu S M, Njinju SM, Kinaga PN. 2010. Effect of Protein Endotoxins *CryIac* and *Cry2Ab2* Expressed in Bt Cotton on the Survival and Infectivity of Entomo-Pathogenic Nematode *Steinernema Karii*. *Nematoda*: 598-604.
- Naranjo SE. 2011 mpacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. *J Agric Food Chem*. 59:5842-5851.
- Nayak P, Basu D, Das S, Basu A, Ghosh D, Ramakrishnan NA, Ghosh M, Sen SK. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing *CryIAc* δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc Natl Acad Sci*. 94:2111-2116.

- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain *Cry* toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection FEMS Microbiol Rev. 37:3-2. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.
- Qaim, Zilberman. 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. Science. 299:900-902.
- Rahmawati S, Slamet-Loedin IH. 2006. Introduksi gen *cryIB-cryIAa* ke dalam genom padi (*Oryza sativa*) cv. Rojolele menggunakan transformasi *Agrobacterium*. Hayati. 13:19-25.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnol J. 9:283-300.
- Sardana R, Dukiandjiev S, Giband M, Cheng X, Cowan K, Sauder C, Altosaar I. 1996. Plant Cell Rep. 15:677-681.
- Stewart Jr, CN, Adang MJ, All JN, Raymer PL, Ramachandran S, Parrott W. 1996a. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* Gene. Plant Physiol. 112:115-120. https://doi.org/112/1/115 [pii].
- Stewart Jr CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA. 1996b. Transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* Gene. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.112.1.121.
- Sutton DW, Havstad PK, Kemp JD. 1992. Synthetic *cryIIIa* gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. Plant Physiol Genet. Transgenic Rse. p. 199.

- Tian JC, Liu ZC, Chen M, Chen Y, Chen XX, Peng YF, Hu C, Ye GY. 2010. Laboratory and field assessments of prey-mediated effects of transgenic Bt rice on *Ummeliata insecticeps* (Araneida: Linyphiidae). *Environ Entomol.* 39:1369-77. doi: 10.1603/EN10003.
- Tian JC, Chen Y, Li ZL, Li K, Chen M, Peng YF, Hu C, Shelton AM, Ye GY. 2012. Transgenic *Cry1Ab* rice does not impact ecological fitness and predation of a generalist spider. *PLoS One.* 7(4):e35164. doi: 10.1371/journal.pone.0035164.
- Usyati N, Buchori D, Manuwoto S, Hidayat P, Slamet-Loedin IH. 2009. Keefektivan padi transgenik terhadap hama penggerek batang padi kuning *Scirpophaga incertulas* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae). *J Entomol Indones.* 6:30-41.
- Vásquez-Padrón RI, Gonzáles-Cabrera J, Garcia-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopéz-Revilla R, Hernández M, Morena-Fierra L, de la Riva GA. 2000. *Cry1Ac* protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.*;271:54–58. doi: 10.1006/bbrc.2000.2584.
- Wabiko H, Yasuda E. 1992. *Bacillus thuringiensis* protoxin: location of toxic border and requirement of non-toxic domain for high-level in vivo production of active toxin. *Transgenic Res.* 1:228-36.
- Wu G, Cui H, Ye G, Xia Y, Sardana R, Cheng X, Shu Q. 2002. Inheritance and expression of the *cry1Ab* gene in Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice. *Theor Appl Genet.* 104:727-734. <https://doi.org/10.1007/s001220100689>
- Zakharyan RA. 1979. Plasmid DNA from *Bacillus thuringiensis*. *Microbiologiya.* 48:226-229.

Zhang X, Huo Z, You C, Hu F. 2014. Effects of volatiles in twenty non-host plants on the repellented and attractive behaviors of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. J. South China Agric Univ. 35:63-68.

Zhu YC, Adamczyk J. 2004. PCR confirmation of the *cry1Ac* Gene in Transgenic BT (Bollgard ®) COTTON. Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, TX-Jan. 5, 023672, 1849-1851. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht212>