

Bioasai Tanaman Kedelai Transgenik *pinII* terhadap Hama Penggerek Polong (*Etiella zinckenella*, Treitschke)

Sutrisno, Saptowo J. Pardal, Diani Damayanti, M. Herman, Riri Sundasari, dan
Endang Ibrahim

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Kegiatan bioasai tanaman kedelai transgenik generasi R₃ telah dilakukan di Laboratorium dan rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT), Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor TA. 2002. Tujuan penelitian adalah mendapatkan tanaman kedelai transgenik R₃ yang tahan terhadap hama penggerek polong kedelai (*Etiella zinckenella* Tr.). Sepuluh tanaman kedelai W₁ hasil penembakan dengan gen *proteinase inhibitor II* (*pinII*) dari event WP₁ (4 tanaman) dan WP₂ (6 tanaman) ditanam pada pot/ember plastik yang berisi campuran tanah, pupuk kandang, dan kompos, dan dipelihara di dalam rumah kaca FUT. Setelah tanaman berumur 50 hari, setiap tanaman diinfeksi dengan 5 pasang imago dewasa penggerek polong kedelai, kemudian tanaman ditutup dengan plastik milar berbentuk tabung/silinder dengan tutup kain kasa pada bagian atasnya. Pengamatan dilakukan pada waktu menjelang panen dengan menghitung persentase serangan polong dan biji. Hasil bioasai menunjukkan bahwa persentase serangan polong terendah dijumpai pada tanaman WP₁₋₁₋₁ (51,8%) dan tertinggi pada tanaman WP₁₋₁₋₄ (100%). Persentase serangan biji terendah juga dijumpai pada WP₁₋₁₋₁ (44,3%) dan tertinggi pada WP₁₋₁₋₄ (100%). Namun hasil bioasai ini masih perlu dikonfirmasi dengan uji secara molekuler agar hasilnya lebih meyakinkan.

Kata kunci: Bioasai, kedelai transgenik R₃, ketahanan, penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.)

ABSTRACT

Bioassay on R₃ generation of transgenic soybean plants to pod borer (*Etiella zinckenella*, Tr.) larvae has been conducted at Biosafety Containment of IABGRRRI in year 2002 the APBN research budgets. The objective of this assay was to obtain transgenic soybean plants resistant to pod borer. Transgenic soybean seeds of WP₁ (4 plants) and WP₂ (6 plants) events were planted in greenhouse of Biosafety Containment. On fifty days after plantation, each plant was infested with 5 pair of pod borer imago, and then covered with plastic cover (to avoid escaped insects). Observation was carried out on pods before harvesting. The observation was focus on the percentage pod and seed damages. Result indicated that all 10 transgenic soybean plants were not so resistant to pod borer larvae compared to control plants. The lower pod and seed damages attacked by pod borer showed on event WP₁₋₁₋₁ (51.8% and 44.3%). While the highest pod and seed damages found on event WP₁₋₁₋₄ (100% and 100%). This result should be confirm with molecular analysis to ensure the transgenic plants.

Key words: Bioassay, R₃ transgenic soybean plants, resistance, pod borer (*Etiella zinckenella*, Tr.)

PENDAHULUAN

Bioasai merupakan uji umum secara biologi untuk mengetahui ketahanan suatu galur/varietas tanaman terhadap hama atau penyakit target. Uji dilakukan dengan cara menginfestasi atau menginokulasikan hama/patogen target pada tanaman yang diuji. Tanaman dianggap tahan apabila menunjukkan persentase mortalitas larva yang rendah atau tidak adanya gejala pada tanaman yang diuji tersebut (Balai Penelitian Tanaman Pangan, 1985). Uji bioasai ini juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat ekspresi suatu gen sisipan pada tanaman hasil transformasi genetik. Tanaman hasil transformasi genetik dan keturunannya dapat diuji ketahanannya terhadap hama/penyakit target dengan cara bioasai ini. Tanaman tahan atau tanaman yang menunjukkan hasil uji bioasai positif (persentase mortalitas rendah/tidak ada gejala penyakit) dapat diartikan bahwa tanaman tersebut mengekspresikan protein produk dari gen sisipan (Herman *et al.*, 2000). Hilder *et al.* (1987) melakukan transformasi tanaman tembakau dengan gen *cowpea trypsin inhibitor* atau *serine proteinase inhibitor* ternyata dapat menghambat pertumbuhan serangga *Heliothis virescens*. Murdock *et al.* (1988) melakukan penelitian tentang efek *sistein proteinase inhibitor* terhadap pertumbuhan *cowpea weevil*, sedangkan Shukle dan Murdock (1983) sebelumnya telah mempelajari efek lysozyme, tripsin inhibitor, dan lektin kedelai terhadap pertumbuhan larva *Madusca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae).

Uji ekspresi secara bioasai dapat dilakukan dengan cara *feeding assay*, yaitu sampel tanaman (potongan daun, batang, umbi, buah, biji atau polong) yang akan diuji diinfestasi dengan larva serangga target atau isolat penyakit target baik secara langsung (*in vivo*) atau tidak langsung (di laboratorium/petri) (Herman *et al.*, 2000). Berbagai teknik bioasai telah tersedia untuk menguji resistensi tanaman terhadap serangga baik skala laboratorium, rumah kaca ataupun lapang. Tahap perkembangan serangga yang diinfestasikan juga bervariasi baik dalam bentuk telur, larva maupun nimfa. Bagian tanaman yang diinfestasi juga beragam, bisa batang, daun atau bagian lain yang menjadi target serangan. Selain itu, juga terdapat beberapa teknik untuk menentukan mekanisme resistensi seperti uji antisenosis, antibiosis, dan uji toleransi. Pada uji antibiosis, serangga diinfestasikan pada tanaman atau bahan tanaman di laboratorium, rumah kaca atau lapang (Gatehouse dan Boulter, 1983). Makanan buatan (*artificial diet*) dapat juga digunakan pada uji antibiosis ini. Antibiosis ditentukan dengan mengukur persentase mortalitas larva/pupa dan lama perkembangan larva/pupa (Amirhusin, 2000).

Pada kegiatan ini telah dilakukan bioasai tanaman kedelai transgenik *pinII* generasi R₃ di rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT) Balitbio, dengan tujuan untuk mendapatkan tanaman kedelai transgenik R₃ yang tahan terhadap penggerek polong.

BAHAN DAN METODE

Pengujian bioasai dilaksanakan di ruang “*rearing*” serangga dan rumah kaca terbatas FUT, Balitbio, Bogor, pada TA 2002. Sampel yang uji berupa polong muda tanaman kedelai Wilis transgenik R₃ dari event WP₁ dan WP₂ umur 50-60 hari setelah tanam. Sedangkan serangga uji yang digunakan berupa 5 pasang kupu-kupu (imago) per tanaman.

Pengujian bioasai meliputi beberapa tahap, yaitu (a) koleksi serangga *Etiella zinckenella*, Tr. di lapang, (b) pemeliharaan dan perbanyakan serangga di laboratorium, (c) persiapan tanam, dan (d) infestasi imago pada polong kedelai.

Koleksi Serangga *Etiella zinckenella* Tr. di Lapang

Serangga *E. zinckenella* dikumpulkan dari beberapa lokasi lapang melalui survei. Serangga tersebut selanjutnya dipelihara dan diperbanyak di FUT.

Perbanyakan dan Pemeliharaan Serangga

Telur *E. zinckenella* diinfestasikan pada polong kedelai muda dan dibiarkan menetas setelah 3-4 hari akan menjadi larva di dalam petridish. Stadia larva terdiri dari 5 instar berkisar 13-18 hari. Larva instar lima dipindahkan dalam serbuk gergaji halus dan akan membentuk pupa di dalam rumah kepompong serbuk gergaji. Stadia pupa berkisar antara 9-15 hari dan akan muncul imago. Imago siap digunakan untuk pengujian. Masa pertumbuhan telur sampai imago (kupu-kupu) berkisar antara 28-41 hari.

Persiapan Tanam

Sepuluh tanaman kedelai Wilis transgenik (R₃) dan satu tanaman Wilis non transgenik ditanam di pot plastik dan dipelihara di dalam rumah kaca FUT dan diberi label. Pemupukan dan penyiraman dilakukan secara teratur sesuai prosedur/ kebutuhan untuk pemeliharaan tanaman. Setelah tanaman mulai besar/tinggi, tanaman diberi ajir (tiang penyangga) agar tanaman tetap berdiri tegak.

Infestasi Imago *Etiella zinckenella* Pada Polong Kedelai

Tanaman kedelai berumur 50 hari dan mulai berpolong siap dibioasai. Sepuluh polong muda dari setiap tanaman disampling (dipilih di tempat yang berbeda) dan diinfestasi dengan 5 pasang imago serangga dewasa. Tanaman yang sudah diinfestasi selanjutnya ditutup dengan plastik milar berbentuk silinder (tabung) yang diberi penutup kain kasa pada bagian atasnya.

Pengamatan dilakukan setelah polong dipanen dengan parameter pengamatan meliputi persentase jumlah polong terserang dan biji terserang. Kemudian tingkat ketahanan tanaman dikelompokkan berdasarkan kriteria Akib dan Baco (1985) sebagai berikut:

Serangan polong (%)	Kriteria ketahanan
0-10%	Tahan
11-30%	Agak tahan
31-50%	Agak peka
51-70%	Peka
71-100%	Sangat peka

HASIL DAN PEMBAHASAN

Benih kedelai transgenik dipilih dari biji sehat hasil bioasai tanaman kedelai Wilis event WP₁ dan WP₂ generasi R₂ (event tanaman hasil penembakan gen *pinII* pada varietas Wilis). Sebanyak 10 tanaman Wilis *pinII* (WP₁ = 4 tanaman dan WP₂ = 6 tanaman) dan satu pot tanaman kontrol Wilis telah dibioasai secara langsung (*in vivo*) dengan 5 pasang imago *E. zinckenella* Tr. di rumah kaca FUT. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa secara umum tanaman kedelai Wilis *pinII* generasi R₃ tidak tahan terhadap serangan hama penggerek polong. Rata-rata persentase serangan polong di atas 60%, bahkan ada yang 100% terserang. Persentase serangan polong terendah dijumpai pada tanaman WP₁₋₁₋₁, yaitu 51,8% dan serangan polong tertinggi pada tanaman WP₁₋₁₋₄ sebesar 100%. Demikian juga untuk persentase serangan biji. Serangan biji terendah juga dijumpai pada tanaman WP₁₋₁₋₁ (44,3%) dan tertinggi juga pada tanaman WP₁₋₁₋₄ (100%). Persentase serangan biji pada kontrol Wilis adalah 95,4% (pada Tabel 1).

Imago dari penggerek polong yang dilepaskan dalam kurungan plastik yang berisi tanaman Wilis transgenik *pinII* sebagian besar dapat hidup dan ada yang langsung mati. Kupu-kupu yang hidup kemudian hinggap dan bertelur pada batang dan polong muda kedelai. Telur sebagian besar menetas dan larvanya langsung berusaha menggerek masuk ke dalam polong. Polong yang terserang oleh larva ditandai dengan adanya lubang gerk dan butir-butir kotoran kuning atau coklat muda yang terikat satu sama lain oleh benang pintal. Larva *Etiella* sp. yang telah dewasa menggerek dari bagian dalam polong untuk ke luar. Larva selanjutnya berjalan-jalan disepanjang polong dan setelah cukup dewasa akhirnya jatuh ke tanah untuk membentuk pupa. Sebagian pupa berkembang menjadi imago lagi dan terbang di dalam kurungan.

Dari hasil pengamatan secara visual/langsung maupun dari data serangan hama terhadap polong dan biji kedelai yang diuji menunjukkan

Tabel 1. Hasil bioasai pada 10 tanaman kedelai Wilis R₃ dengan imago *Etiella* sp. di rumah kaca FUT, 2002

Kode tanaman	Persentase polong terserang	Persentase biji terserang	Ketahanan
WP ₁₋₁₋₁	51,8	44,3*	Peka
WP ₁₋₁₋₂	80,3	73,5	Sangat peka
WP ₁₋₁₋₃	81,6	86,9	Sangat peka
WP ₁₋₁₋₄	100	100**	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₁	76,9	77,7	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₂	94,9	96,2	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₃	70,6	69,6	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₄	91,2	93,1	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₁₁	98,8	96,1	Sangat peka
WP ₂₋₄₆₋₁₂	66,4	59,3	Peka
Wilis (kontrol)	95,4	96,7	Sangat peka

* = event paling baik, ** = event paling buruk

Kriteria ketahanan berdasarkan Akib dan Baco (1985)

bahwa secara garis besar tanaman kedelai transgenik *pinII* generasi R₃ ini tidak tahan terhadap hama penggerek polong (*E. zinckenella* Tr.). Hal ini kemungkinan besar karena rendahnya tingkat ekspresi gen *pinII* pada tanaman tersebut sehingga tidak mampu menghambat atau mematikan larva *Etiella* sp. yang memakan/menggerek polong kedelai tersebut. Hasil penelitian Ryan (1990) dan Johnson *et al.* (1989), melaporkan apabila gen *pinII* ditransfer ke dalam kromosom tanaman dan mampu diekspresikan, maka serangga yang memakan bagian dari tanaman transgenik tersebut akan terganggu sistem pencernaannya, terhambat pertumbuhannya dan akhirnya mati jika level penghambatan pencernaan protein yang tinggi. Jadi untuk penghambatan pertumbuhan larva *Etiella* sp., diperlukan konsentrasi *pinII* yang cukup tinggi agar proses pencernaan protein dalam usus serangga tersebut terganggu.

Kemungkinan lain, tanaman kedelai generasi R₃ yang diuji tersebut tidak membawa gen *pinII* (tidak stabil integrasinya), sehingga tanaman tidak mengekspresikan *pinII*. Akibatnya tanaman kedelai tersebut hanya mengekspresikan sedikit *trypsin inhibitor* endogen (inhibitor khas pada kedelai), sehingga larva *Etiella* sp. tidak terhambat pertumbuhannya walaupun telah memakan polong/biji kedelai tersebut. *Etiella* sp., merupakan hama penggerek polong pada kedelai, sehingga kemungkinan besar serangga ini telah beradaptasi terhadap inhibitor yang ada pada tanaman tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Sepuluh tanaman kedelai Wilis *pinII* generasi R₃ tidak tahan terhadap hama penggerek polong, tetapi satu tanaman kedelai Wilis *pinII* generasi R₃ (WP1-1-1) memiliki persentase serangan polong dan biji terendah (51,8% dan 44,3%), infestasi imago secara langsung (*in vivo*) pada tanaman menggambarkan kondisi sebenarnya di lapangan.

Tanaman dengan persentase serangan polong/biji terendah diuji lebih lanjut pada generasi berikutnya, baik secara molekuler maupun bioasai untuk mengetahui kestabilan ekspresi gen *pinII* pada tanaman kedelai transgenik tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Akib, W. dan D. Baco. 1985.** Ketahanan varietas kedelai terhadap penggerek polong *Etiella zinckenella* (Trietsche). Prosiding Simposium Hama Palawija. Perhimpunan Entomologi Indonesia Cabang Bandung. Balai Penelitian Tanaman Pangan Sukamandi. hlm. 58-62.
- Amirhusin, B. 2000.** Peranan dan potensi diatery insectisidal protein dalam rekayasa genetika tanaman tahan hama. Buletin AgroBio 3(2):74-79.
- Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor. 1985.** Petunjuk bergambar untuk identifikasi hama dan penyakit kedelai di Indonesia. The Strengthening of Legume in Relation to Cropping System Research Project (ATA-218). Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor, Japan International Cooperation Agency (JICA).
- Gatehouse, A.M.R. and D. Boulter. 1983.** Assesment of the antimetabolic effect of trypsin inhibitor from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on the development of bruccid beetle *Callosobrochus maculatus*. J. Sci. Food Agric. 34:345-350.
- Herman, M., S.J. Pardal, D. Damayanti, T.I.R. Utami, dan E. Listanto. 2000.** Laporan hasil penelitian transformasi tanaman kedelai tahan terhadap hama dan penyakit. Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bogor.
- Hilder V.A., A.M.R. Gatehouse, R.F. Baker, and D. Boulter. 1987.** A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 330:160-163.
- Johnson, R., J. Navaez, G. An, and C. Ryan. 1989.** Expression of proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: Effect on natural defense against *Mandusca sexta* larvae. Natl. Acad. Sci. USA 86:9871-9875.
- Murdock, L.L., R.E. Shade, and M.A. Pomery. 1988.** Effects of E-64, a cysteine proteinase inhibitor on cowpea weevil growth, development and fecundity. Environ. Entomol. 17:467-469.

- Ryan, C.A. 1990.** Proteinase inhibitor in plant: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Rev. Phytopath.* 28:425-449.
- Shukle, R.H. and I.L. Murdock. 1983.** Lypogenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: Effect on larval growth of *Manduca Sexta* (lepidoptera: Sphingidae). *Environ. Entomol.* 12:787-791.