Insersi Gen *cry*1Ab pada Tanaman Kedelai melalui Penembakan Partikel

Saptowo J. Pardal, M. Herman, T.I.R. Utami, Edy Listanto, Budi Santosa, Slamet, Ika Mariska, Sri Hutami, dan Ali Husni

ABSTRAK

Perakitan tanaman kedelai transgenik tahan hama penggerek polong menggunakan gen *cry*1Ab merupakan alternatif yang potensial dalam perbaikan tanaman. Gen tersebut dapat menghasilkan protein δ-endotoksin yang bersifat racun (insektisidal) terhadap larva serangga hama Lepidoptera. Insersi gen *cry*1Ab menggunakan metode penembakan partikel telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen pada tahun 2004. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan tanaman kedelai hasil transformasi yang mengandung insersi gen *cry*1Ab. Dua varietas kedelai, Sindoro dan Wilis telah digunakan dalam penelitian ini. Sebanyak 230 kalus yang yang berasal dari eksplan embrio muda kedelai Wilis telah ditembak dengan plasmid *p*SBB yang mengandung gen *cry*1Ab dan *p*RQ6 yang mengandung gen *hph* (ketahanan terhadap higromisin) secara ko-transformasi. Penembak gen (*gene gun*) yang digunakan adalah Biolistic PDS 1000 He dari Biorad. Hasil regenerasi dan seleksi kalus Wilis hasil transformasi pada media yang mengandung higromisin diperoleh 28 embrio somatik yang kemudian tumbuh menjadi 5 planlet. Namun, kelima planlet ini gagal diaklimatisasikan. Kemudian sebanyak 810 kalus embrio Sindoro yang ditransformasi dengan plasmid dan metode yang sama menghasilkan 154 embrio somatik dan tumbuh menjadi 27 benih somatik (planlet). Planlet ini selanjutnya diaklimatisasi dan 2 di antaranya telah berhasil tumbuh menjadi tanaman. Analisis molekuler terhadap 22 kalus kedelai hasil transformasi dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik menunjukkan 8 sampel positif mengandung gen *cry*1Ab. Kemudian analisis molekuler terhadap 5 sampel DNA daun dari planlet kedelai Sindoro hasil regenerasi menunjukkan positif mengandung gen *cry*1Ab.

Kata kunci: Kedelai, insersi, gen *cry*1Ab, particle bombardment.

PENDAHULUAN

Penggerak polong (*Etiella zinckenella*, Tr.) merupakan hama penting kedelai yang masih sulit dikendalikan hingga saat ini. Pengendalian secara kimia dengan aplikasi insektisida kurang efektif karena sifat larva hama yang menyerang masuk ke dalam polong sehingga terhindar dari insektisida. Selain itu, aplikasi insektisida akan mencemari lingkungan akibat residu yang ditimbulkan dari bahan aktif insektisida (Nurdin *et al*. 1995). Penggunaan varietas tahan adalah cara pengendalian yang paling ekonomis dan aman terhadap lingkungan. Namun, hingga saat ini belum ditemukan sumber gen ketahanan terhadap penggerek polong pada plasma nutfah kedelai yang ada, sehingga menjadi kendala dalam persilangan secara konvensional.

Perakitan varietas kedelai tahan melalui pendekatan bioteknologi dengan teknik rekayasa genetik merupakan alternatif yang potensial (Herman 1996; 1997). Perakitan varietas tanaman tahan terhadap serangga melalui teknik transformasi genetik telah banyak berhasil dilakukan menggunakan gen tunggal yang mengkode protein penghambat ataupun racun seperti Bt-endotoksin (Cheng *et al*. 1992; Warren *et al*. 1992), *proteinase inhibitor* (Johnson *et al*. 1989; Ryan 1990), *cowpea trypsin inhibitor, pea seed lectin*, dan *chitinase* (Asano *et al*. 1991; Gatehouse *et al*. 1991).

Gen *cry* atau gen Bt merupakan gen anti serangga yang sudah terbukti efektif. Gen ini diisolasi dari bakteri tanah *Bacillus thuringiensis* yang dapat mengkode kristal protein racun yang dikenal sebagai δ-endotoksin. Gen *cry* telah banyak jenisnya dan masing-masing jenis memiliki serangga target yang berbeda. Gen *cry*1 misalnya efektif terhadap Lepidoptera saja. Insersi gen *cry*1Ab pada tanaman kedelai diharapkan dapat dihasilkan tanaman kedelai tahan terhadap hama penggerek polong (*E. zinckenella*, Tr) yang tergolong dalam Lepidoptera.

Insersi gen asing ke dalam genom tanaman dapat dilakukan secara langsung maupun tidak langsung. Penembakan partikel (*particle bombardment*) merupakan teknik insersi gen secara langsung yang paling banyak digunakan. Tingkat keberhasilan teknik ini dapat mencapai 10-20%.

Kelebihan teknik ini adalah bersifat universal, artinya dapat diterapkan hampir pada semua jenis sel, jaringan, dan tanaman (Herman 1996). Namun, teknik ini memerlukan biaya operasional yang mahal karena memerlukan partikel emas sebagai pembawa plasmid (*microcarrier*). Selain itu, jumlah kopi gen biasanya lebih dari satu, sehingga kurang stabil (Satoto 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman kedelai hasil transformasi yang mengandung insersi gen *cry*1Ab melalui teknik penembakan partikel.

BAHAN DAN METODE

Dua varietas kedelai, Wilis dan Sindoro digunakan sebagai sumber eksplan. Benih kedelai ditanam di dalam pot ember besar (5 kg) dan dipelihara di rumah kaca. Eksplan berupa embrio muda diambil dari biji/polong muda kedelai umur 15 hari setelah pembungaan (*anthesis*).

Plasmid *p*SBB sebagai pembawa gen *cry*1Ab dan *p*RQ6 sebagai pembawa gen *gus* dan *hph* (gen seleksi higromisin) dilekatkan (presipitasikan) pada partikel emas yang berdiameter 1 dan 1,6 μm dengan bantuan spermidin dan $CaCl_2$. Kemudian plasmid ditembakkan ke eksplan kedelai dengan *Gene Gun* tipe Biolistic PDS1000/He dari BioRad.

BAHAN DAN METODE

Penyisipan gen *cry*1Ab pada eksplan kedelai dilakukan berdasarkan metode Sanford *et al.* (1993). Eksplan yang digunakan sebagai target sel adalah kalus embriogenik yang berasal dari embrio muda kedelai. Insersi menggunakan sistem ko-transformasi antara plasmid *p*SBB sebagai pembawa gen *cry*1Ab dan plasmid *p*RQ6 sebagai pembawa gen *gus* dan *hph* dengan perbandingan 4 : 1.

Penembakan menggunakan tekanan gas Helium 1100 *psi*, vakum 27 cmHg, jarak tembak antara partikel dan eksplan 6 cm dengan satu kali tembakan. Selanjutnya eksplan yang telah ditembak dipindahkan ke media pemulihan (*recovery*) selama 7 hari, lalu ditumbuhkan pada media seleksi pertama (media M4C yang mengandung higromisin 15 mg/l). Eksplan yang hidup dalam kondisi tersebut dipindahkan ke media seleksi kedua (media M4C yang mengandung higromisin 30 mg/l). Apabila kalus berproliferasi secara cepat, sebagian kalus dianalisis PCR untuk mendeteksi keberadaan gen *cry*1Ab secara dini. Kalus lainnya ditumbuhkan pada media regenerasi untuk mendapatkan embrio somatik. Selanjutnya embrio dipindahkan ke media perakaran untuk mendapatkan planlet kedelai yang siap diaklimatisasi ke media tanah.

Analisis Molekuler Kalus/Planlet/Tanaman Kedelai Hasil Transformasi

Isolasi DNA mengikuti prosedur plant DNA zol^R (Invitrogen). Sebanyak 5 μl DNA dicek kualitas dan kuantitasnya dengan elektroforesis pada 0,8% agarosa 0,5 x TBE pada tegangan 5V/cm selama satu jam. Hasil elektroforesis direndam pada larutan ethidium bromida dan dipendarkan di bawah sinar UV untuk direkam pada Chemidoc. DNA yang berkualitas baik akan menghasilkan pita yang tajam dan berukuran besar. Konsentrasi DNA diperkirakan dengan membandingkan intensitas DNA sampel dengan intensitas pita DNA Lambda yang telah diketahui massanya yang disertakan pada gel elektroforesis. Dari hasil pengukuran konsentrasi ini, DNA diencerkan untuk diseragamkan konsentrasinya sebesar 100 ng/μl.

PCR dilakukan dengan primer IDT *A foward*-1 (5'-CGA CAT CTC CTT GTC CTT TGA CAC-3') dan primer IDT B *reverse*-2 (5'-ACA CCC TGA CCT AGT TGA GCA AC-3') yang akan secara spesifik mengamplifikasi gen *cry*1Ab untuk menghasilkan pita DNA berukuran 1 kb. Campuran PCR terdiri atas DNA dengan berat 100 ng, 1X PCR bufer yang mengandung 25 mM $MgCl_2$, dNTPs dengan konsentrasi akhir 0,2 mM, primer spesifik dengan konsentrasi akhir (masing-masing) 0,4 μM, Taq polimerase 1,25 unit, dan air untuk memperoleh volume akhir sebesar 25 μl. Sebagai kontrol positif digunakan plasmid *p*SBB yang mengandung gen *cry*1Ab. Kontrol negatif terdiri atas kontrol

yang tidak menggunakan *template* DNA dan kontrol dari tanaman yang tidak ditransformasi. Kontrol negatif yang tidak menggunakan *template* berfungsi untuk melihat kemungkinan terjadinya kontaminasi PCR, sedangkan kontrol tanaman *non-treatment* digunakan untuk melihat keberadaan *indogenous* gen *cry*1Ab pada tanaman kedelai.

Kondisi PCR yang digunakan adalah sebagai berikut: denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama lima menit, denaturasi untuk siklus dilakukan pada suhu yang sama selama satu menit, kemudian diikuti oleh *annealing* pada suhu 45°C selama satu menit dan elongasi pada suhu 72°C selama dua menit. Siklus ini diulang sebanyak 35 kali dan diikuti dengan elongasi akhir pada suhu yang sama selama lima menit. Hasil PCR dicek dengan elektroforesis pada 1,4% gel agarosa TBE. Visualisasi dilakukan seperti cara yang telah diterangkan sebelumnya. Analisis data dilakukan berdasarkan ada tidaknya pita DNA berukuran 1 kb yang merupakan ukuran dari DNA/gen *cry*1Ab.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Insersi Gen *Cry*1Ab pada Kalus Embriogenik Varietas Wilis

Pada Wilis telah dilakukan tiga kali penembakan dengan jumlah eksplan sebanyak 230 kalus. Hasil seleksi kalus secara bertahap pada media yang mengandung higromisin 15 mg/l dan 30 mg/l hanya diperoleh embrio somatik sebanyak 28 (12,2%). Embrio ini selanjutnya dikecambahkan dan menghasilkan 5 planlet (2,2%). Namun, kelima planlet ini tidak dapat tumbuh menjadi tanaman, karena mati setelah diaklimatisasi ke media tanah (Tabel 1).

Secara rinci hasil insersi gen *cry*1Ab pada kalus Wilis adalah sebagai berikut:

- Insersi ke-1 dilakukan pada 70 kalus embrio muda, diperoleh 30 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 15 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan tidak diperoleh embrio somatik dan benih somatik karena tidak berkembang.
- Insersi ke-2 dilakukan pada 80 kalus embrio muda, diperoleh 60 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 45 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan tersebut diperoleh 13 embrio somatik dan terbentuk 5 benih somatik yang tidak menghasilkan tanaman kedelai sempurna karena tidak berkembang.
- Insersi ke-3 dilakukan pada 80 kalus embrio muda, diperoleh 55 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 29 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan tersebut diperoleh 15 embrio somatik dan tidak didapatkan benih somatik karena membusuk.

Insersi Gen *Cry*1Ab pada Kalus Embriogenik Varietas Sindoro

Pada Sindoro telah dilakukan 5 kali penembakan dengan jumlah eksplan sebanyak 810 kalus. Hasil seleksi kalus secara bertahap pada media yang mengandung higromisin 15 mg/l dan 30 mg/l menghasilkan 154 embrio somatik (19,01%). Setelah Embrio dikecambahkan hanya menghasilkan 27 planlet (3,3%). Namun, setelah planlet diaklimatisasikan ke media tanah hanya berhasil diperoleh 2 tanaman (0,3%). Kedua tanaman tersebut dapat tumbuh baik dan berpolong di rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT) (Tabel 2).

Hasil secara rinci insersi gen *cry*1Ab pada kalus Sindoro adalah sebagai berikut:

- Insersi ke-1 dilakukan pada 190 kalus embrio muda varietas Sindoro diperoleh 70 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 50 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan diperoleh 25 embrio somatik dan terbentuk 6 benih somatik yang hanya menghasilkan 2 tanaman kedelai sempurna dan mati setelah diaklimatisasi.

- Insersi ke-2 dilakukan pada 180 kalus embrio muda varietas Sindoro diperoleh 95 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 52 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan diperoleh 31 embrio somatik dan terbentuk 5 planlet, namun planlet tersebut mati setelah diaklimatisasi.
- Insersi ke-3 dilakukan pada 120 kalus embrio muda varietas Sindoro diperoleh 51 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 46 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan diperoleh 36 embrio somatik dan terbentuk 5 planlet, tetapi tidak dapat tumbuh menjadi tanaman (mati).
- Insersi ke-4 dilakukan pada 240 kalus embrio muda varietas Sindoro diperoleh 110 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 90 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan diperoleh 42 embrio somatik dan terbentuk 6 planlet, tetapi akhirnya gagal diaklimatisasikan menjadi tanaman (mati).
- Insersi ke-5 dilakukan pada 80 kalus embrio muda varietas Sindoro diperoleh 57 kalus tahan media seleksi I (mengandung higromisin 15 mg/l), dan jumlahnya berkurang menjadi 49 kalus tahan media seleksi II (higromisin 30 mg/l). Dari kalus yang tahan diperoleh 20 embrio somatik dan menghasilkan 5 planlet. Kelima planlet tersebut setelah diaklimatisasi hanya 2 planlet yang dapat tumbuh menjadi tanaman dan berpolong di rumah kaca FUT.

Dari Tabel 1 dan 2 dapat diketahui bahwa rata-rata eksplan yang lolos pada media seleksi semakin menurun jumlah/persentasenya lebih kurang 50% dari jumlah total sebelum ditransformasi. Hal ini diduga karena sebagian eksplan yang ditumbuhkan pada media seleksi I (mengandung 15 mg/l higromisin) tidak mampu bertahan hidup. Hanya sel-sel kalus yang telah terinsersi gen *hph* yang dapat bertahan hidup di media seleksi yang mengandung antibiotik higromisin. Proses penembakan yang dilakukan dengan 1 kali tembakan memungkinkan penyebaran partikel emas pada eksplan tidak merata, sehingga pada saat ditumbuhkan dalam media seleksi sebagian eksplan kalus menunjukkan respon berbeda, ada yang tahan dan sebaliknya. Menurut Finer dan Mc.Mullen (1991), medium yang yang mengandung antibiotik higromisin digunakan untuk seleksi tanaman transgenik dan bukan untuk mematikan eksplan. Jaringan embriogenik yang telah tertransformasi memiliki pertumbuhan dan ukuran eksplan yang normal. Sedangkan jaringan yang tidak tertransformasi tidak dapat hidup di medium seleksi. Hal itu ditunjukkan dengan eksplan kalus berwarna coklat, proliferasi lambat dan tidak adanya kalus embriogenik yang dibentuk. Pendapat yang sama dinyatakan Brown (1991) bahwa, seleksi gen rekombinan hasil transformasi dapat dilakukan dengan berbagi cara, salah satunya dengan menumbuhkan gen rekombinan pada medium seleksi yang mengandung antibiotik. Biasanya vektor plasmid membawa sedikitnya satu gen yang menyebabkan sel inang bersifat resisten terhadap antibiotik. Resis-

Tabel 1. Hasil seleksi dan regenerasi kalus Wilis setelah insersi dengan gen *cry*1Ab.

UI	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan tahan seleksi I	Jumlah eksplan tahan seleksi II	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet	Jumlah tanaman
1.	70	30	15	0	0	0
2.	80	60	45	13	5	0
3.	80	55	29	15	0	0
Jumlah	230	145 (63,04%)	89 (38,7%)	28 (12,2%)	5 (2,2%)	0 (0%)

Tabel 2. Hasil seleksi dan regenerasi kalus Sindoro setelah insersi dengan gen *cry*1Ab.

UI	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan tahan seleksi I	Jumlah eksplan tahan seleksi II	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet	Jumlah tanaman
1.	190	70	50	25	6	0
2.	180	95	52	31	5	0
3.	120	51	46	36	5	0
4.	240	110	90	42	6	0
5.	80	57	49	20	5	2
Jumlah	810	383 (47,3%)	287 (35,4%)	154(19,01%)	27 (3,3%)	2 (0,3%)

tensi tergantung pada enzim yang dikode oleh plasmid di dalam sel yang telah ditransformasi. Salah satu gen yang digunakan dalam kegiatan penelitian insersi gen ini adalah gen *hph* (gen ketahanan higromisin). Gen *hph* terdapat pada konstruksi plasmid *p*RQ6 yang dapat membantu dalam seleksi eksplan yang tahan higromisin.

Jumlah eksplan yang bertahan hidup di media seleksi I rata-rata mengalami penurunan lebih kurang 15-50% ketika ditumbuhkan di media seleksi II. Hal ini diduga karena bertambah tingginya konsentrasi higromisin yang digunakan dari 15 mg/l menjadi 30 mg/l. Penambahan konsentrasi higromisin dimaksudkan agar diperoleh eksplan yang benar-benar tahan, dan kondisi ini menjadi salah satu indikator untuk mengetahui ekspresi gen yang disisipkan. Terjadinya variasi persentase penurunan jumlah eksplan yang ditumbuhkan pada media seleksi II, diduga dipengaruhi oleh berbagai faktor. Selain tinggi rendahnya ekspresi gen *hph* yang disisipkan. Kemungkinan lain, eksplan pada media seleksi I terhindar (*escape*), artinya ada bagian eksplan yang tidak langsung menyentuh permukaan media dan tetap tumbuh, sehingga seolah-olah eksplan tersebut tahan tumbuh di media seleksi I akan tetapi pada saat ditumbuhkan di media seleksi II, eksplan tidak mampu bertahan hidup. Faktor lainnya, diduga akibat terjadinya kerusakan sel-sel pada jaringan target akibat penembusan oleh partikel emas (*microcarier*), yang menyebabkan kemampuan daya hidup sel menjadi rendah (Birch dan Bower 1994).

Embrio somatik yang terbentuk dari eksplan yang tahan di media seleksi II dalam setiap penembakan bervariasi jumlahnya. Penembakan pertama pada kalus embriogenik varietas Sindoro, diperoleh 25 embrio somatik dari 50 eksplan. Penembakan kedua dan penembakan seterusnya secara berturut-turut diperoleh 31 embrio somatik dari 52 eksplan, 36 embrio somatik dari 46 eksplan, 42 embrio somatik dari 90 eksplan dan 20 embrio somatik dari 49 eksplan yang tahan di media seleksi II. Sementara itu, embrio somatik yang terbentuk dari eksplan kalus embriogenik varietas Wilis, pada penembakan pertama dari 15 eksplan yang tahan seleksi II tidak terbentuk embrio somatik. Eksplan tidak mengalami pertumbuhan lebih lanjut dalam arti lain eksplan mengalami *stagnasi*. Diperoleh 13 embrio somatik dari 45 eksplan pada penembakan kedua serta 15 embrio somatik dari 29 eksplan pada penembakan ketiga.

Terjadinya variasi jumlah embrio somatik yang terbentuk dalam setiap kali penembakan yang dilakukan terhadap varietas yang berbeda maupun yang sama diduga dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain kualitas kalus yang digunakan sebagai eksplan target transformasi. Sulitnya menentukan karakteristik kalus yang potensial embriogenik dari eksplan embrio muda kedelai menjadi kendala dalam menyiapkan eksplan target yang homogen, akibatnya ada kemungkinan sebagian kalus yang diduga potensial embriogenik dalam kenyataannya tidak, sehingga pada saat eksplan kalus tidak potensial embriogenik ditransformasi, tidak akan berkembang membentuk embrio somatik sekalipun tahan di media seleksi II. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pardal *et al*. (1997), bahwa rendahnya jumlah kalus yang embriogenik mungkin disebabkan embrio somatik yang dihasilkan rata-rata berukuran kecil sehingga sulit dikecambahkan/diregenerasikan. Faktor lain yang diduga menjadi penyebab adalah perbedaan sumber eksplan. Hal ini terlihat dari data yang diperoleh, eksplan yang berasal dari varietas Sindoro menunjukkan respon lebih tinggi daripada eksplan yang berasal dari varietas Wilis. Menurut Trijatmiko dan Harjosudarmo (1996), perbedaan respon pembentukan embrio somatik sangat dipengaruhi oleh faktor genotip eksplan.

Perkembangan eksplan berikutnya setelah membentuk embrio somatik adalah terbentuknya benih somatik atau dikenal pula dengan istilah planlet hingga terbentuknya tanaman dewasa di mana telah terbentuk daun dan akar dengan sempurna. Data pada Tabel 1 dan 2 menunjukkan rendahnya persentase keberhasilan terbentuknya benih somatik dan tanaman dewasa. Keadaan tersebut diduga anatara lain karena adanya pengaruh dari proses transformasi yang dilakukan. Adanya gen asing yang menyisip pada tanaman menyebabkan tanaman melakukan respon yang berbeda dari perilaku normal (saat belum dilakukan proses transformasi). Penelitian terdahulu mengenai regenerasi kedelai bukan hasil transformasi menunjukkan bahwa pertumbuhan embrio somatik menjadi planlet dan tanaman dewasa tidak mengalami kendala yang berarti pada media yang sesuai. Namun setelah ditransformasi eksplan dan embrio somatik lebih sulit

diregenerasikan. Akan tetapi terjadinya kondisi tersebut sampai saat ini belum diketahui secara pasti penyebabnya. Diperlukan penelitian lebih spesifik untuk mengetahui faktor-faktor yang menghambat pertumbuhan tersebut.

Hal penting setelah eksplan tahan di media seleksi membentuk planlet hingga tanaman dewasa adalah proses aklimatisasi. Aklimatisasi adalah suatu tahapan yang cukup kritis karena tanaman yang ditumbuhkan dalam kondisi *in vitro* harus melakukan adaptasi dengan lingkungan *in vivo*. Data yang disajikan pada Tabel 1 dan 2 menunjukkan sulitnya eksplan beradaptasi dalam tahap aklimatisasi. Eksplan tahan seleksi II yang berhasil membentuk planlet banyak mengalami kematian saat dipindahkan ke media tanah (aklimatisasi), sehingga gagal diperoleh tanaman hasil transformasi. Sebetulnya berbagai metode aklimatisasi telah dicoba, namun tingkat keberhasilannya masih belum dapat diulang secara baik. Kondisi planlet saat diaklimatisasi diduga sebagai penentu utama keberhasilan proses aklimatisasi, di samping kondisi tanah dan lingkungan tempat aklimatisasi. Keadaan ini membutuhkan penelitian lebih khusus untuk mengkaji faktor-faktor yang menjadi kendala dalam proses aklimatisasi tanaman kedelai hasil transformasi.

Untuk mendeteksi keberhasilan proses insersi gen *cry*1Ab secara dini pada tanaman kedelai telah dilakukan analisis molekuler dengan PCR pada tahap kalus dan planlet. Sebanyak 22 sampel kalus hasil insersi/penembakan telah berhasil diisolasi DNA secara mini-preparasi, dan selanjutnya dianalisis PCR dengan primer spesifik. Pengecekan terhadap DNA hasil PCR pada gel elektroforesis menunjukkan bahwa ada 8 sampel DNA kalus positif mengandung gen *cry*1Ab sebesar 1 kb. Kalus positif PCR selanjutnya diregenerasikan dan diperoleh sejumlah planlet. Analisis PCR terhadap lima sampel DNA yang diekstraksi dari daun planlet kedelai Sindoro hasil transformasi menunjukkan semuanya positif mengandung gen *cry*1Ab (menghasilkan pita 1 kb). (lihat pada Gambar 3).

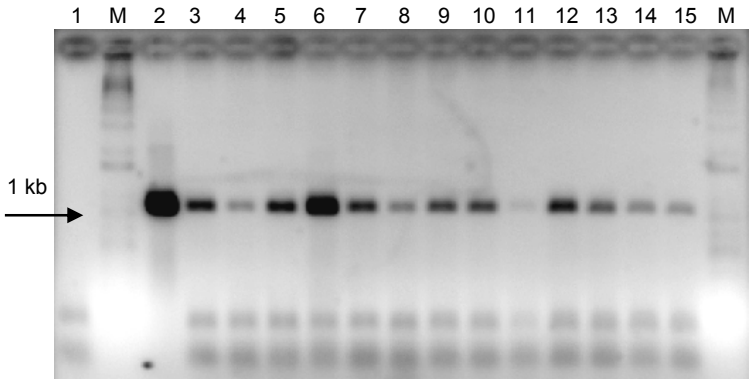
Gambar 1. Planlet kedelai Sindoro hasil transformasi.

Gambar 2. Tanaman kedelai Sindoro positif gen *cry*IAb yang berhasil diaklimatisasi di rumah kaca FUT.

Selain dilakukan deteksi secara dini keberadaan gen *cry*1Ab pada kalus kedelai hasil transformasi/insersi, pada penelitian ini juga dilakukan *feeding assay* (uji biologi) kalus hasil insersi terhadap larva penggerek polong (*E. zinckenella*, Tr.) yang menjadi hama sasaran. Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui efektifitas gen *cry*1Ab terhadap larva target secara dini. Sejumlah kalus kedelai hasil transformasi telah diinfestasi dengan larva penggerek polong instar 1, 2, dan 3 pada petri uji. Hasil pengamatan pada 5 hari setelah infestasi menunjukkan bahwa pengujian dengan larva instar 3 memberikan hasil yang paling bagus, di mana terdapat perbedaan angka kematian larva yang nyata antara kalus hasil transformasi dan bukan hasil transformasi. Sebanyak 26 kalus kedelai hasil transformasi yang diinfestasi menunjukkan persentase kematian larva sebesar 26,9% pada 5 hari setelah infestasi, sedangkan pada 8 kalus kedelai bukan hasil transformasi menunjukkan persentase kematian larva 0%. Meskipun efektifitas gen *cry*1Ab pada kalus kedelai hasil transformasi ini masih rendah, namun hal ini membuktikan bahwa gen *cry*1Ab yang diinsersikan ke dalam kalus kedelai telah diekspresikan. Pada Gambar 4 diperlihatkan bahwa larva penggerek polong instar 3 mati/kering setelah memakan kalus kedelai hasil transformasi.

KESIMPULAN

Telah berhasil dilakukan insersi gen *cry*1Ab ke dalam kalus kedelai Wilis dan Sindoro melalui penembakan partikel dengan dihasilkannya lima planlet yang positif mengandung gen *cry*1Ab pada uji PCR. Planlet tersebut telah diaklimatisasi dan dua di antaranya telah tumbuh menjadi tanaman dewasa dan berpolong di rumah kaca FUT. *Feeding assay* kalus kedelai hasil transformasi dengan larva penggerek polong instar 3 menunjukkan adanya ekspresi dari gen *cry*1Ab, meskipun masih rendah levelnya.



Gambar 3. Hasil PCR DNA kalus dan planlet kedelai transforman. 1 = H_2O, M = 1 kb leader plus, 2 = *p*SBB, 3-7 = DNA planlet Sindoro, 8-15 = DNA Kalus.

Gambar 4. Hasil *feeding assay* kalus kedelai transforman dengan larva instar 3 *E. zinckenella*,Tr. Larva mati/kering (tanda panah).

DAFTAR PUSTAKA

Asano, Y., Y. Otsuki, and R.L. Meeusun. 1991. Insect control with genetically engineered crops. Tibtech. 9:197-200.

Birch, R.G. and R. Bower. 1994. Principles of gene transfer using particle bombardment. *In* Sun-Yang, N. and P. Christou (*Eds*.). Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Oxford Univ. Press, New York. p 3-37.

Cheng, J., M.G. Bolyard, R.C. Saxena, and M.B. Sticklen. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a δ-endotoxingene from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. Plant Sci. 1:83-91.

Finer, J.J. and M.D. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embriogenic suspension culture tissue. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 27P:175-182.

Gatehouse, J.A., V.A. Hilder, and A.M.R. Gatehouse, 1991. Genetic egineering of plants for insect resistance. *In* Gierson, D. (*Ed*.). Plant Genetic Engineering. Chapman and Hall, Inc. New York. p. 105-135.

Herman, M. 1996. Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. AgroBio. Vol. 1. Balitbio, Bogor.

Herman, M. 1997. Insect resistant plants via genetic engineering. The Proceeding of Conference of Agricultural Biotechnology II. Jakarta, June 13-15, 1995.

Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.

Listanto, E., S.J. Pardal, and Kan Wang. 1996. A simple method of DNA isolation from transgenic maize plant for polymerase chain reaction. Indonesian Journal for Agricultural Biotechnology 1(1):33-38.

Nurdin, F., F. Artati, dan Atman. 1995. Hama penggerek polong kedelai (*Etiella* Spp.) biologi, serangan, dan pengendaliannya. Buletin Teknik Sukarami 8:9-18.

Pardal, S.J., E. Listanto, P. Robeff, K. Hagemann, K. Wang, and J. Tippett. 1996. Maize transformation with cry genes for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hub.) resistance. Indonesian Journal for Agricultural Biotechnology 1(1):1-11.

Pardal, S.J., D.R. Untari, A. Sisharmini, D. Rijadi, dan M. Herman. 1997. Regenerasi kedelai secara *in vitro*. *Dalam* Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia (PBPI), Surabaya. PBPI, Bogor. hlm. 27-38.

Slamet-Loedin, I., W. Rahayu, P. Deswina, S. Purwanto, E.S. Mulyaningsih, D. Sudhakar, J.A. Gatehouse, I. Allosaar, and P. Christou. 1998. Production of fertile transgenic aromatic Indonesian javanica rice co-expressing the snowdrop lectin and *cry*IAb anti-insect proteins. Proc. Of the 4th Asia-Pacific Conference on Agric. Biotech.

Trijatmiko, K.R. dan J. Harjosudarmo. 1996. Regenerasi tanaman kedelai melalui embriogenesis somatik. Jurnal Bioteknologi Pertanian 1(2):55-59.