

# Perakitan Tanaman Padi Transgenik untuk Ketahanan terhadap Hama Penggerek Batang

A. Dinar Ambarwati, Ida Hanarida, Aniversari Apriana, Tri J. Santoso, Iswari S. Dewi, Atmitri Sisharmini, dan I Made Samudra

## ABSTRAK

Penggerek batang padi (*Scirpophaga* sp.) merupakan salah satu hama utama yang menyerang pertanaman padi di Indonesia dan menyebabkan penurunan produksi. Pemuliaan secara konvensional sulit dilakukan karena belum ditemukannya sumber gen ketahanan pada plasma nutfah padi. Rekayasa genetika melalui teknik transformasi menawarkan peluang untuk memindahkan gen ketahanan yang diisolasi dari organisme lain ke dalam genom tanaman padi. Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan untuk perakitan tanaman padi tahan hama yang meliputi 3 kegiatan, yaitu analisis molekuler tanaman putatif transgenik padi *cryIA(b)* Taipei-309 generasi T5, bioasai tanaman putatif transgenik padi *cryIA(b)* Taipei-309 generasi T5 serta analisis molekuler dan bioasai lanjutan tanaman putatif transgenik Taipei-309 generasi T4. Analisis molekuler untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *cryIA(b)* dilakukan dengan menggunakan teknik PCR sedangkan untuk mendeteksi ekspresi protein gen *cryIA(b)* dilakukan dengan pengujian immunostrip. Dari 165 tanaman padi putatif transgenik T-309 generasi T5 diperoleh 85 tanaman (51,1%) yang positif mengandung gen *cryIA(b)* melalui pengujian PCR dan 50 tanaman (30,3%) mengekspresikan protein *cryIA(b)* dengan konsentrasi yang rendah melalui pengujian immunostrip. Sedangkan dari 83 tanaman padi putatif transgenik T-309 generasi T4 diperoleh 38 tanaman (45,8%) yang positif mengandung gen *cryIA(b)* melalui pengujian PCR dan 31 tanaman (37,4%) mengekspresikan protein *cryIA(b)* dengan konsentrasi yang rendah melalui pengujian immunostrip. Hasil bioasai secara *in planta* menunjukkan adanya variasi tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang padi. Dari 50 tanaman padi transgenik T-309 generasi T5 yang diuji ternyata ada 13 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala sundep) maupun generatif (gejala beluk), yaitu 4 tanaman nomor T5-93 (2, 3, 4, dan 5), 3 tanaman nomor T5-95 (2, 3, dan 9), 5 tanaman nomor T5-103 (4, 8, 12, 14, dan 15), 1 tanaman nomor T5-105-3 dan 1 tanaman nomor T5-112-1. Tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori tahan ada 1 tanaman, yaitu nomor T5-73-6. Sedangkan dari 31 tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 yang diuji ternyata ada 8 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala sundep) maupun generatif (gejala beluk), yaitu 5 tanaman nomor T4-1 (5, 16, 21, 23, dan 24), 1 tanaman nomor T4-2-12, 1 tanaman nomor T4-3-1, dan 1 tanaman nomor T4-4-10. Tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori tahan ada 9 tanaman, yaitu nomor T4-1-12, 2 tanaman, yaitu nomor T4-2 (15 dan 18), 1 tanaman nomor T4-3-8 dan 5 tanaman nomor T4-4 (13, 16, 17, 22, dan 30).

**Kata kunci:** Padi transgenik, gen *cryIA(b)*, analisis molekuler, bioasai, hama penggerek batang.

## ABSTRACT

Rice stem borer (*Scirpophaga* sp.) is considered as one of primary pests causing yield decrease in Indonesia. Conventional breeding for stem borer resistance in rice has difficulty, due to the sources of resistance gene is lacking in rice germplasm. Genetic engineering on the other hand, offers a means to introduce into rice genome, genes which confer increased tolerance to pests. This continuation experiment consist of 3 activities, i.e: molecular analysis of putative transgenic rice of T-309 T5 generation, bioassay of putative transgenic rice T-309 T5 generation, and molecular analysis and bioassay of putative transgenic rice T-309 T4 generation. Molecular analysis to confirm the existence of *cryIA(b)* gene have been conducted through PCR technique while for detecting the expression of Bt- *cryIA(b)* protein conducted using a immunostrip testing. Out of 165 T5 generation transgenic putative rice plants have been gained 85 plants (51.1%) containing the *cryIA(b)* gene using PCR testing and 50 plants (30.0%) expressed a low concentration of *cryIA(b)* protein using the immunostrip testing. Meanwhile, Out of 83 T4 generation transgenic putative rice plants have been gained 38 plants (45,8%) containing the *cryIA(b)* gene using PCR testing and 31 plants (37,4%) expressed the a low concentration of *cryIA(b)* protein using the immunostrip testing. Result of *in planta* bioassay showed that level of resistance to rice stem borer was varied among T4 and T5 generation. Among 50 of T5-generation of putative T-309 transgenic rice plants only 13 plants were highly resistance to stem borer either in vegetative (deadheart symptoms) or generative (whitehead symptoms) stage of growth. They were 4 plants of T5-93 (2, 3, 4, and 5), 3 plants of T5-95 (2, 3, and 9), 5 plants of T5-103 (4, 8, 12, 14, and 15), 1 plant of T5-105-3 and 1 plat of T5-112-1. Meanwhile, only 1 plant categorized as resistance to stem borer, i.e. T5-73-6. Among 31 of T4-generation of putative T-309 transgenic rice plants only 8 plants were highly resistance to stem

borer either in vegetative or generative stage of growth. They were 5 plants of T4-1 (5, 16, 21, 23, and 24), 1 plant of T4-2-12, 1 plants of T4-3-1, dan 1 plant of T4-4-10. Meanwhile, plants categorized as resistance to stemborer were 9 plants, i.e 1 plant of T4-1-12, 2 plants of T4-2 (15 dan 18), 1 plant of T4-3-8 and 5 plant of T4-4 (13, 16, 17, 22, and 30).

**Key words:** Transgenic rice, *cryIA(b)* gene, molecular analysis, bioassay, rice stem borer.

## PENDAHULUAN

Penggerek batang padi (*Scirpophaga* sp. Wlk.) merupakan salah satu hama utama yang menyerang tanaman padi. Menurut Badan Pusat Statistik (2002), dari 112.918 ha luas atau area pertanaman padi di 29 provinsi di Indonesia, menunjukkan adanya intensitas serangan penggerek batang padi sebesar 39,08%. Sehingga ketersediaan varietas unggul yang mempunyai ketahanan terhadap hama penggerek batang padi sangat diperlukan untuk pelestarian produksi padi di Indonesia.

Perakitan varietas untuk mendapatkan tanaman padi yang mempunyai ketahanan terhadap hama dapat dilakukan melalui rekayasa genetik, karena pemuliaan secara konvensional sulit dilakukan mengingat belum diperolehnya sumber gen ketahanan dalam plasma nutfah padi. Gen ketahanan yang biasa digunakan untuk perakitan varietas tahan hama diisolasi dari *Bacillus thuringiensis* (Bt), yang bertanggung jawab untuk menghasilkan Bt-toksin. Gen ini dikelompokkan menjadi 6 kelas utama, yaitu *cryIA* sampai *cryVI*. Gen *cryIA* adalah gen pengkode Bt toksin yang efektif terhadap hama dari golongan Lepidoptera sehingga dapat digunakan untuk mengendalikan hama penggerek batang (Wunn *et al.* 1996).

Gen ketahanan yang sudah diisolasi dan dikonstruksi tersebut dapat dipindahkan ke dalam genom tanaman melalui teknik transformasi secara langsung (penembakan partikel, elektroporasi) maupun secara tidak langsung dengan vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Prakash dan Varadarajan 1992; Songstad *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 1996).

Di samping proses transformasi, perakitan tanaman transgenik melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler seperti analisis PCR dan Southern Blot untuk identifikasi gen yang telah diintroduksi ke dalam jaringan tanaman (Bennet 1993). Analisis molekuler untuk mendeteksi keberadaan suatu gen sisipan pada tanaman hasil transformasi dapat dilakukan dengan analisis menggunakan teknik PCR. Dengan teknik PCR, sekuen DNA gen target yang diapit oleh primer oligonukleotida spesifik dari gen tersebut dapat diamplifikasi sebanyak pengulangan siklus dalam proses PCR sehingga dapat diidentifikasi keberadaan gen tersebut dalam genom tanaman. Untuk mendeteksi ekspresi protein pada tanaman transgenik dapat dilakukan melalui pengujian immunostrip.

Pengujian bioasai tanaman transgenik dilakukan untuk mengetahui tingkat ekspresi/ketahanan tanaman terhadap hama sasaran, di mana perbedaan tingkat ekspresi gen menyebabkan terjadinya tingkat ketahanan yang bervariasi pada populasi tanaman transgenik yang diuji (Wu 1997). Metode bioasai pada tanaman padi dapat dilakukan dengan cara *feeding assay* pada sampel yang akan diuji, baik secara tidak langsung (*in vivo*) maupun secara langsung (*in planta*) (IRRI 1996).

Penelitian perakitan tanaman padi transgenik tahan hama dengan menyisipkan gen *cryIA* melalui teknik penembakan partikel telah dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian dan telah menghasilkan tanaman putatif transgenik *cryIA(b)*, *cryIA(c)* pada varietas Taipei-309 (T-309) dan Asemandi (Hanarida *et al.* 1998) dan beberapa tanaman T-309 generasi To, T1, T2, atau T3 yang positif mengandung gen *cryIA(b)* melalui analisis PCR serta tahan terhadap hama penggerek batang padi pada uji bioasai dengan tingkat ketahanan agak tahan sampai sangat tahan (Hanarida *et al.* 2000; Ambarwati *et al.* 2001; 2002). Dari tanaman putatif transgenik yang sudah diperoleh, belum semuanya diuji secara molekuler maupun bioasai, sehingga penelitian masih perlu dilanjutkan untuk melihat kestabilan integrasi dan ekspresi gen *cryIA* serta kegiatan bioasai untuk melihat keefektifannya terhadap hama penggerek batang padi.

Penelitian tahun 2004 akan difokuskan pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 dengan melakukan analisis molekuler gen *cryIA(b)* dan bioasai lanjutan pada generasi T5. Di samping itu, akan dilakukan evaluasi pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T4 yang belum diuji pada tahun 2003, baik secara molekuler maupun bioasai.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium dan rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT), Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, pada tahun anggaran 2004. RPTP Perakitan Tanaman Padi Transgenik untuk Ketahanan terhadap Hama Penggerek Batang terdiri dari 3 kegiatan, yaitu (1) analisis molekuler tanaman putatif transgenik padi *cryIA(b)* Taipei-309 generasi T5, (2) bioasai tanaman putatif transgenik padi *cryIA(b)* Taipei-309 generasi T5, dan (3) analisis molekuler dan bioasai lanjutan tanaman putatif transgenik Taipei-309 generasi T4. Untuk kegiatan (1) dan (2) materi yang diuji adalah 13 nomor tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T4 yang mengandung gen *cryIA(b)* dan mengekspresikan protein *cryIA(b)* serta agak tahan pada pengujian bioasai. Dari masing-masing nomor tanaman akan diambil 10 sampai 15 tanaman. Sedangkan untuk kegiatan (3) materi yang diuji adalah tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T4 yang belum diuji pada tahun 2003.

### Analisis Molekuler Tanaman Putatif Transgenik Padi *CryIA(b)* Taipei-309 Generasi T5

#### Isolasi DNA Jaringan Tanaman

DNA total genomik akan diekstraksi dari tanaman padi transgenik dan tanaman kontrol yang akan diuji mengikuti prosedur miniprep CTAB. Daun diambil dan digerus dengan nitrogen cair dan hasil gerusan dimasukkan dalam eppendorf 1,5 ml kemudian ditambahkan 500  $\mu$ l bufer ekstraksi dan divorteks. Setelah diperoleh gerusan sampel yang lembut, ditambahkan 25  $\mu$ l SDS 20% dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit dalam *waterbath*. Larutan ditambah dengan 85  $\mu$ l NaCl 5 M dan dicampur dengan membolakbalikkan eppendorf, kemudian ditambah dengan 67,5  $\mu$ l CTAB 10% dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Campuran ditambah dengan 675  $\mu$ l chloroform dan dicampur dengan baik kemudian disentrifugasi selama 2 menit. Supernatan diambil, dipindah ke eppendorf baru dan ditambah 50  $\mu$ l NaOAc 3 M dan 450  $\mu$ l isopropanol dingin. Campuran disentrifugasi untuk mengendapkan DNA pada 8000 rpm selama 5 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan ethanol 70% dan dikeringkan. DNA dilarutkan kembali dengan 100  $\mu$ l bufer TE.

#### Analisis PCR

Pengujian PCR akan dilakukan dengan total volume reaksi 25  $\mu$ l yang mengandung 100 ng DNA genomik sebagai cetakan, 10  $\mu$ M masing-masing dNTPs, 1 unit enzim *Taq DNA Polimerase* dalam larutan bufer dan masing-masing 0,2  $\mu$ M primer *reverse* dan *forward* yang spesifik untuk gen *cryIA(b)*. Sintesis urutan basa dari primer-primer tersebut adalah 5'-CGA CAT CTC CTT GTC CTT GAC AC-3' dan 5'-ACA CCC TGA CCT AGT TGA GCA AC-3'. Reaksi amplifikasi dilakukan berdasarkan metode Wang *et al.* (1993) yang dimodifikasi dengan menggunakan mesin PCR MJ Research PCT-100. Program PCR terdiri dari inkubasi awal pada 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus pada 94°C selama 1 menit, 45°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit. Siklus terakhir untuk pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Sebanyak 10  $\mu$ l produk PCR digunakan untuk elektroforesis pada 1% gel agarose.

#### Uji Immunostrip

Daun digerus dan diencerkan dengan bufer ekstraksi sampel SEB4 dengan perbandingan 1 : 20 (g/ml) dan didiamkan selama 30 detik sebelum digunakan untuk pengujian immunostrip. Diambil satu strip *Bt-cryIA(b)/cryIA(c)* dan dipegang pada bagian ujung yang ditandai dengan nama pengujian. Strip selalu dijaga pada posisi vertikal, kemudian 0,5 cm atau ¼ inci dari ujung

strip yang bertanda *sample* dicelup atau dimasukkan ke dalam ekstrak. Dua buah pita/garis akan muncul dalam 3-5 menit pada kontrol positif. Apabila sampel yang diuji menunjukkan pola dan jumlah pita yang sama dengan kontrol positif maka dikatakan hasil immunostrip positif, sedangkan apabila tidak terbentuk pita/garis maka sampel dikatakan negatif.

### **Bioasai Tanaman Putatif Transgenik Padi *CryIA(b)* Taipei-309 Generasi T5**

#### **Persiapan**

Tanah sawah yang telah dipupuk lengkap (90 kg N, 90 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, dan 90 kg K<sub>2</sub>O per ha) ditempatkan pada ember plastik dan ditanami satu bibit padi tanaman transgenik dan non-transgenik berumur 3 minggu. Penanaman dilakukan per nomor tanaman. Pemeliharaan tanaman dilakukan sesuai dengan rekomendasi teknik budi daya padi.

#### **Pemeliharaan Populasi Hama Penggerek Batang di Rumah Kaca**

Serangga harus selalu dikoleksi dari hasil survei di lapang karena hama penggerek batang padi belum dapat diperbanyak secara laboratorium. Serangga tersebut selanjutnya akan dipelihara di dalam rumah kaca pada pertanaman populasi padi yang telah disiapkan. Telur-telur kemudian dipelihara sampai menghasilkan larva instar 1.

#### **Inokulasi Larva Penggerek ke Tanaman Uji**

Metode bioasai secara *in planta* dilakukan pada tanaman yang menunjukkan uji PCR dan immunostrip positif. Infestasi dilakukan dengan cara memasukkan 5 ekor larva instar 1 ke bagian pangkal daun dekat batang, pada tanaman berumur 6 minggu setelah tanam (MST) untuk pengamatan sundep atau 9 MST untuk pengamatan beluk. Pengamatan dilakukan pada saat 2 minggu setelah infestasi dan skoring ketahanan dihitung berdasarkan persentase intensitas serangan (IRRI 1996). Skoring tingkat ketahanan (%) terhadap serangan hama penggerek pada tahap vegetatif (sundep) adalah sangat tahan = 0, tahan = 1-20, agak tahan = 21-40, agak rentan = 41-60, rentan = 61-80, sangat rentan = 81-100. Sedangkan skoring tingkat ketahanan (%) terhadap serangan hama penggerek pada tahap generatif (beluk) adalah sangat tahan = 0, tahan = 1-10, agak tahan = 11-25, agak rentan = 26-40, rentan = 41-60, sangat rentan = 61-100.

#### **Analisis Molekuler dan Bioasai Lanjutan Tanaman Putatif Transgenik Taipei-309 Generasi T4**

Analisis molekuler dan bioasai dilakukan pada tanaman putatif transgenik Taipei-309 yang belum sempat diuji pada tahun 2003 ( $\pm 90$  tanaman atau 25% dari 354 tanaman). Prosedur atau metode pengujian molekuler dan bioasai seperti yang digunakan pada pengujian tanaman putatif transgenik generasi T5.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Keberhasilan teknik transformasi ditandai dengan keberhasilan menyisipkan rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam genom tanaman, dapat diekspresikan dan tetap terpelihara pada generasi selanjutnya sehingga diperoleh fenotipe baru yang diinginkan (Koziel *et al.* 1996). Pada penelitian tahun 2003 telah berhasil didapatkan tanaman padi transgenik Taipei-309 generasi T4 yang positif mengandung gen *cryIA(b)*, mengekspresikan protein *cryIA(b)* dan hasil bioasai menunjukkan tanaman tersebut tahan terhadap hama penggerek batang padi.

Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan dan kestabilan transgen di dalam jaringan dari satu generasi ke generasi selanjutnya dari tanaman putatif transgenik. Pada metode ini, digunakan dua primer nukleotida spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen *cryIA(b)*. Fragmen DNA yang dihasilkan dari amplifikasi gen tersebut akan mempunyai ukuran 1000 pasang basa (1 Kb). Hasil analisis disajikan pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa dari 165 tanaman yang diuji diperoleh 85 (51,1%) tanaman yang menunjukkan positif mengandung gen *cryIA(b)* yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang mempunyai ukuran 1000 bp (1 Kb), sesuai dengan ukuran pita DNA dari kontrol positif (gen *cryIA(b)*) (Gambar 1).

Untuk mendeteksi ekspresi protein *cryIA(b)* dilakukan pengujian immunostrip pada 85 tanaman yang positif pada analisis PCR. Hasil menunjukkan hanya 50 (30,3%) tanaman yang positif mengekspresikan protein *cryIA(b)*, yang ditandai dengan terbentuknya 2 pita/garis pada strip seperti pada kontrol positif. Namun demikian, pita yang terbentuk tidak setebal pada kontrol positif, hal ini berarti ekspresi protein *cryIA(b)* pada tanaman transgenik tersebut rendah (Gambar 2).

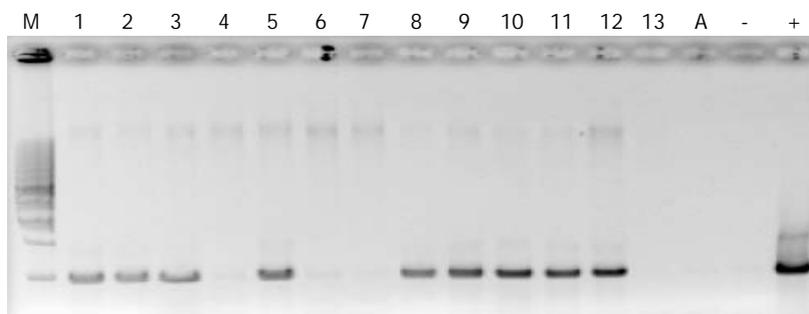
Sedangkan hasil analisis molekuler dengan menggunakan teknik PCR pada tanaman putatif transgenik T-309 generasi T4 disajikan pada Tabel 2. Dari 83 tanaman (4 nomor) yang diuji, menunjukkan ada 38 (45,8%) tanaman yang positif mengandung gen *cryIA(b)* yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA yang berukuran 1000 bp(1 kb) yang sesuai dengan pita DNA pada kontrol positif (gen *cryIA(b)*) (Gambar 3).

Sedangkan hasil uji immunostrip menunjukkan ada 31 (37,4%) tanaman yang positif mengekspresikan protein *cryIA(b)*. Uji immunostrip menunjukkan hasil yang sama dengan tanaman transgenik padi T-309 generasi T5, yaitu konsentrasi protein yang terbentuk lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol positif. Rendahnya konsentrasi protein *cryIA(b)* yang dihasilkan oleh tanaman transgenik tersebut perlu dikonfirmasi dengan hasil bioasai untuk melihat keefektifan protein terhadap hama penggerek batang padi (*Scirpophaga incertulas*).

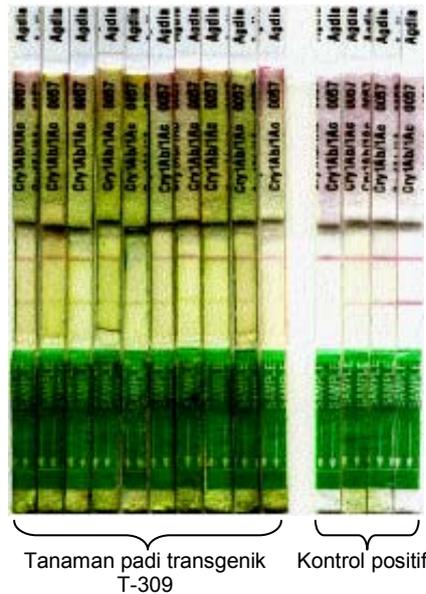
Bioasai pada tanaman transgenik dilakukan untuk mendapatkan kategori tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang. Bioasai dilakukan dengan secara *in planta* terhadap hama penggerek batang padi kuning. Bioasai dilakukan pada 50 tanaman transgenik T-309

**Tabel 1.** Hasil analisis PCR dan immunostrip tanaman padi transgenik T-309 generasi T5.

No. tanaman (T5)	Jumlah tanaman	PCR positif	Immunostrip positif
2	14	7	3
8	14	6	4
25	15	5	4
29	12	6	5
62	13	9	8
73	13	7	3
81	11	3	1
86	13	11	6
93	14	7	4
95	13	9	5
103	15	8	5
105	6	2	1
112	10	5	1
Jumlah	165	85	50



**Gambar 1.** Hasil analisis PCR tanaman padi transgenik T-309 generasi T5. M = marker DNA, 1-13 = tanaman padi generasi T5, A = air, - = kontrol negatif (tanaman non transgenik), + = kontrol positif (gen *cryIA(b)*).



**Gambar 2.** Hasil uji immunostrip pada tanaman padi transgenik T-309.

**Tabel 2.** Hasil analisis PCR dan immunostrip tanaman padi transgenik T-309 generasi T4.

No. tanaman (T4)	Jumlah tanaman	PCR positif	Immunostrip positif
1	24	15	14
2	20	8	5
3	9	3	2
4	30	12	10
Jumlah	83	38	31

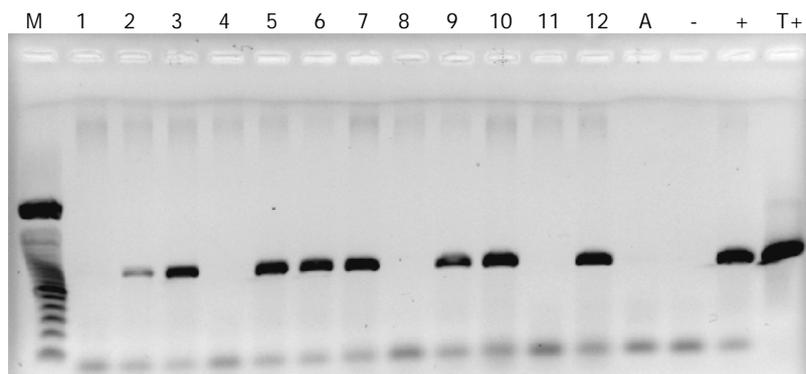
generasi T5 yang menunjukkan hasil positif pada analisis PCR dan immunostrip. Dalam pengujian bioasai secara *in planta* setiap rumpun tanaman dibagi, untuk perbanyak benih (calon generasi T6), dan untuk pengujian bioasai. Hasil bioasai secara *in planta* pada 50 tanaman padi transgenik T-309 generasi T5 disajikan pada Tabel 3 dan 4.

Hasil bioasai dengan gejala serangan sundep, menunjukkan adanya variasi tingkat ketahanan terhadap hama penggerek batang, yang dimulai dari kategori sangat tahan sampai sangat rentan. Tingkat ketahanan tanaman yang paling banyak adalah pada kategori agak tahan, yaitu 19 tanaman (41,3%) dan sangat tahan 14 tanaman (30,4%). Pada pengamatan gejala serangan sundep tidak dijumpai tanaman dengan kategori ketahanan rentan (Tabel 3).

Hasil bioasai dengan gejala serangan beluk hanya didapatkan tiga kategori ketahanan terhadap hama penggerek batang, yaitu sangat tahan, tahan, dan agak tahan. Tingkat ketahanan yang paling banyak adalah kategori agak tahan, yaitu 16 tanaman (32%).

Tampak bahwa tanaman putatif transgenik T5 yang diuji mengekspresikan tingkat ketahanan yang berbeda-beda pada setiap nomor, baik untuk ketahanan pada fase vegetatif (gejala sundep) maupun pada fase generatif (gejala beluk). Pada tanaman putatif transgenik yang menunjukkan kategori sangat tahan, tahan serta agak tahan dijumpai larva yang mati lebih banyak dibandingkan kategori lain, di samping ukuran larva yang lebih kecil (data tidak disajikan). Oleh karena itu, tampak ukuran larva yang ditemukan pada batang padi, saat pengamatan sundep dan beluk, berbeda-beda.

Dari tanaman padi transgenik T-309 generasi T5 ternyata ada 13 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif maupun generatif, yaitu 4 tanaman



**Gambar 3.** Hasil analisis PCR pada tanaman transgenik padi T-309 generasi T4. M = marker DNA, 1-12 = tanaman padi T-309 generasi T4, A = air, - = kontrol negatif (tanaman non transgenik), + = kontrol positif (gen *cryIA(b)*), T+ = kontrol positif (tanaman transgenik).

**Tabel 3.** Hasil bioasai *in planta* pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T5 terhadap hama penggerek batang padi kuning (sundep).

Tingkat ketahanan	Banyaknya tanaman
Sangat tahan	14
Tahan	8
Agak tahan	19
Agak rentan	3
Rentan	0
Sangat rentan	2
Total	46

**Tabel 4.** Hasil bioasai *in planta* pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T5 terhadap hama penggerek batang padi kuning (beluk).

Tingkat ketahanan	Banyaknya tanaman
Sangat tahan	13
Tahan	4
Agak tahan	16
Agak rentan	0
Rentan	0
Sangat rentan	0
Total	33

nomor T5-93 (2, 3, 4, dan 5), 3 tanaman nomor T5-95 (2, 3, dan 9), 5 tanaman nomor T5-103 (4, 8, 12, 14, dan 15), 1 tanaman nomor T5-105-3 dan 1 tanaman nomor T5-112-1. Sedangkan tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan katagori tahan ada 1 tanaman, yaitu nomor T5-73-6.

Bioasai juga dilakukan pada 31 tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 yang menunjukkan hasil positif pada pengujian PCR maupun immunostrip. Hasil bioasai pada tanaman padi transgenik generasi T4 disajikan pada Tabel 5 dan 6.

Hasil bioasai dengan gejala serangan sundep pada tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 menunjukkan adanya variasi tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang padi, yaitu dengan kategori sangat tahan, tahan, dan agak rentan (Tabel 5). Sedangkan kategori tingkat ketahanan agak tahan, rentan, dan sangat rentan tidak dijumpai pada tanaman yang diuji. Tingkat ketahanan yang paling banyak adalah pada kategori tahan, yaitu 17 tanaman (60,7%), diikuti katagori sangat tahan, yaitu 10 tanaman (35,7%), dan agak rentan hanya 1 tanaman (0,3%). Sedangkan pada tanaman kontrol (non transgenik) hasil bioasai menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori rentan.

**Tabel 5.** Hasil bioasai *in planta* pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T4 terhadap hama penggerek batang padi kuning (sundep).

Tingkat ketahanan	Banyaknya tanaman
Sangat tahan	10
Tahan	17
Agak tahan	0
Agak rentan	1
Rentan	0
Sangat rentan	0
Total	28

**Tabel 6.** Hasil bioasai *in planta* pada tanaman putatif transgenik padi Taipei-309 generasi T4 terhadap hama penggerek batang padi kuning (beluk).

Tingkat ketahanan	Banyaknya tanaman
Sangat tahan	17
Tahan	11
Agak tahan	0
Agak rentan	0
Rentan	0
Sangat rentan	0
Total	28

Hasil bioasai dengan gejala serangan beluk pada tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 juga menunjukkan variasi tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang padi, yaitu dengan kategori sangat tahan dan tahan (Tabel 6). Tingkat ketahanan yang paling banyak adalah pada kategori sangat tahan, yaitu 17 tanaman (60,7%), dan kategori sangat tahan, yaitu 11 tanaman (39,3%).

Dari tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 yang diuji ternyata ada 8 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala sundep) maupun generatif (gejala beluk), yaitu 5 tanaman nomor T4-1 (5, 16, 21, 23, dan 24), 1 tanaman nomor T4-2-12, 1 tanaman nomor T4-3-1, dan 1 tanaman nomor T4-4-10. Sedangkan tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori tahan ada 9 tanaman, yaitu nomor T4-1-12, 2 tanaman, yaitu nomor T4-2 (15 dan 18), 1 tanaman nomor T4-3-8, dan 5 tanaman nomor T4-4 (13, 16, 17, 22, dan 30).

Adanya variasi dalam tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang salah satunya disebabkan oleh perbedaan level protein *cryIA(b)* yang dihasilkan oleh tanaman transgenik. Menurut Wunn *et al.* (1996) banyaknya protein *cryIA(b)* yang bervariasi pada daun tanaman transgenik yang berbeda akan menghasilkan perbedaan dalam tingkat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek batang dari famili Lepidoptera. Hal ini sejalan dengan dengan pendapat Wu (1997) bahwa perbedaan tingkat ekspresi gen *cryIA(b)* menyebabkan terjadinya variasi tingkat ketahanan pada populasi tanaman transgenik yang diuji.

## KESIMPULAN

1. Dari 165 tanaman padi transgenik T-309 generasi T5 diperoleh 85 tanaman (51,1%) yang positif mengandung gen *cryIA(b)* melalui pengujian PCR dan 50 tanaman (30,3%) mengekspresikan protein *cryIA(b)* dengan konsentrasi yang rendah melalui pengujian immunostrip.
2. Dari 83 tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 diperoleh 38 tanaman (45,8%) yang positif mengandung gen *cryIA(b)* melalui pengujian PCR dan 31 tanaman (37,4%) mengekspresikan protein *cryIA(b)* dengan konsentrasi yang rendah melalui pengujian immunostrip.

3. Dari 50 tanaman padi transgenik T-309 generasi T5 yang diuji ternyata ada 13 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala sundep) maupun generatif (gejala beluk), yaitu 4 tanaman nomor T5-93 (2, 3, 4, dan 5), 3 tanaman nomor T5-95 (2, 3, dan 9), 5 tanaman nomor T5-103 (4, 8, 12, 14, dan 15), 1 tanaman nomor T5-105-3, dan 1 tanaman nomor T5-112-1. Sedangkan tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori tahan ada 1 tanaman, yaitu nomor T5-73-6.
4. Dari 31 tanaman padi transgenik T-309 generasi T4 yang diuji ternyata ada 8 tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan sangat tahan pada tahap vegetatif (gejala sundep) maupun generatif (gejala beluk), yaitu 5 tanaman nomor T4-1 (5, 16, 21, 23, dan 24), 1 tanaman nomor T4-2-12, 1 tanaman nomor T4-3-1, dan 1 tanaman nomor T4-4-10. Sedangkan tanaman yang menunjukkan tingkat ketahanan dengan kategori tahan ada 9 tanaman, yaitu nomor T4-1-12, 2 tanaman, yaitu nomor T4-2 (15 dan 18), 1 tanaman nomor T4-3-8, dan 5 tanaman nomor T4-4 (13, 16, 17, 22, dan 30).

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D., Sutrisno, I. Hanarida, M. Herman, T.J. Santoso, I.S. Dewi, A. Apriana, Budihardjo, T. Hadiarto, D. Damayanti, S.J. Pardal, T.I.R. Utami, Djumanto, I. Manzila, A. Husni, D.W. Utami, A. Sisharmini, dan Minantyorini. 2001.** Perakitan tanaman pangan transgenik tahan hama dan penyakit tumbuhan. Laporan Hasil Penelitian TA 2001. 236 hlm.
- Ambarwati, A.D., I. Hanarida, M. Herman, Sutrisno, T.J. Santoso, I.S. Dewi, A. Apriana, S.J. Pardal, T. Hadiarto, T.I.R. Utami, Djumanto, I. Manzila, B. Amirhusin, A. Sisharmini, D. Damayanti, dan E. Listanto. 2002.** perakitan tanaman transgenik tahan hama atau penyakit tahunan. Laporan Hasil Penelitian TA 2002. 237 hlm.
- Badan Pusat Statistik. 2002.** Statistik Indonesia. 638 hlm.
- Bennet, J. 1993.** Genes for crop improvements. Genetic Engineering 16:93-113.
- Hanarida, I., A.D. Ambarwati, A. Apriana, I.S. Dewi, dan E. Listanto. 1998.** Perakitan tanaman padi transgenik tahan hama penggerek batang. Laporan Hasil Penelitian TA 1998/99. 14 hlm.
- Hanarida, I.S., A.D. Ambarwati, E. Listanto, I.S. Dewi, A. Apriana, T.J. Santoso, dan D. Damayanti. 2000.** Evaluasi tanaman padi transgenik tahan hama penggerek batang. Laporan Hasil Penelitian TA 1999/2000. 63 hlm.
- IRRI. 1996.** Standard evaluation system for rice. 4<sup>th</sup> Edition. Inger Genetic Resources Center. 51 p.
- Koziel, M.D., N.B. Carrozi, and N. Dessai. 1996.** Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. Plant Mol. Biol. 32:393-405.
- Oliveira, M.M., C.M. Miquel, and M.H. Raquel. 1996.** Transformation studies in woody fruit species. Plant Tiss. Cul. Biotechnol. 2(2):76-93.
- Prakash, C.S. and U. Varadarajan. 1992.** Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Rep. 11:53-57.
- Songstad, D.D., D.A. Somers, and R.J. Grusbach. 1995.** Advances in alternative DNA delivery techniques. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 40:1-15.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993.** A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21(17):4153-4154.
- Wu, C., Y. Fan, C. Zhang, N. Oliva, and S.K. Datta. 1997.** Transgenic fertile japonica rice plant expression a modified *cryIA(b)* genes resistant to yellow stemborer. Plant Cell Rep. 17:129-132.
- Wunn, J., A. Kloti, P.K. Burkhardt, G. Biswas, K. Lauris. V.A. Iglesias, and I. Ptrylens. 1996.** Transgenic *indica* rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. Bio/Technology 14:171-176.