

Bioasai Tanaman Kedelai Transgenik R2 terhadap *Etiella zinckenella* Tr.

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

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Kegiatan bioasai tanaman kedelai transgenik generasi R2 telah dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT), Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor, TA 2001. Tujuan penelitian adalah mendapatkan tanaman kedelai transgenik R2 yang tahan terhadap hama penggerek polong kedelai (*Etiella zinckenella* Tr.). Benih tanaman kedelai R2 dari event TP1 dan TP2 (hasil penembakan varietas Tidar dengan gen *proteinase inhibitor II (pinII)*) ditanam dalam pot plastik yang berisi campuran tanah, pupuk kandang, kompos, dan dipelihara di dalam rumah kaca FUT. Setelah tanaman berumur 50 hari, setiap tanaman disampling 10 polong di tempat yang berbeda untuk pengujian bioasai. Setiap polong diinfestasi dengan 1-3 ekor larva penggerek polong kedelai yang baru menetas, kemudian ditutup dengan kantong plastik yang telah dilubangi dengan jarum. Pengamatan dilakukan pada saat menjelang panen dengan menghitung persentase kerusakan polong, biji, dan biji sehat. Perkembangan larva penggerek polong diamati dengan menghitung jumlah pupa/imago yang ditemukan. Hasil bioasai 21 tanaman kedelai R2 dari event TP1 (9 tanaman) dan TP2 (12 tanaman) terhadap hama penggerek polong menunjukkan bahwa persentase mortalitas larva berkisar antara 50-90% dengan rata-rata 76,9%, ukuran larva yang hidup berkisar antara 3,6-7 mm dengan rata-rata 5,1 mm. Persentase biji sehat antara 35-70% dengan rata-rata 57,7% dan persentase biji terserang berkisar antara 30-65% dengan rata-rata 42,3%. Tanaman transgenik yang diuji relatif lebih tahan terhadap penggerek polong apabila dibandingkan dengan tanaman kontrol (varietas Tidar bukan hasil trans-formasi). Pada tanaman kontrol rata-rata mortalitas larva sebesar 27,5%, ukuran larva hidup 9,45 mm, biji sehat 7,5%, dan biji terserang 92,5%. Namun hasil bioasai ini masih perlu dikonfirmasi dengan uji secara molekuler agar hasilnya lebih meyakinkan.

Kata kunci: Bioasai, kedelai transgenik R2, ketahanan, penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.)

ABSTRACT

Bioassay on R2 generation of transgenic soybean plants to pod borer (*Etiella zinckenella*, Tr.) has been conducted at Biosafety Containment of RIFCB in year 2001. The objective of this assay was to obtain transgenic soybean plants resistant to pod borer. Transgenic soybean seeds of TP1 and TP2 events were planted in greenhouse of Biosafety Containment. Fifty days after plantation, each plant was sampled ten pods for bioassay. Each pod was infested with 1-3 neonate larvae of pod borer and then covered with small pores plastic bag (to avoid escaped larvae). Observation was carried out on pods before harvesting. The observation was focus on the percentage of larva mortality, pod, and seed damages, number of undamaged seeds, larvae stages or development (number of imago). Result indicated that all 21 transgenic soybean plants were more resistant to pod borer larvae compared to control plants. The range of larvae mortality were 50-90% with average 76.9%, the length of larvae were 3.6-7 mm (average = 5.1 mm). The

percentage of undamaged seeds were 35-70% (average = 57.7%) and the damaged seeds were 30-65% (average = 42.3%) while the control plants has 27.5% larvae mortality, the length of larvae 9.45 mm, undamaged seeds only 7.5% and damaged seeds 92.5%. This result should be confirm with molecular analysis to ensure the transgenic plants.

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

PENDAHULUAN

Uji ekspresi suatu gen sisipan pada tanaman transgenik merupakan tahap yang sangat penting dalam rangkaian perakitan tanaman transgenik. Suatu tanaman hasil transformasi yang telah terbukti mengandung gen sisipan memiliki dua kemungkinan, yaitu gen ada dan diekspresikan dengan baik atau gen ada tetapi tidak diekspresikan dengan baik (sedikit atau tidak sama sekali). Untuk kasus yang kedua, meskipun uji molekuler positif, tetapi hasil uji ekspresi dapat negatif.

Uji ekspresi suatu gen sisipan dapat dilakukan secara biologi atau molekuler. Uji ekspresi secara biologi (*bioassay*) 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).

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, 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. Makanan buatan (*artificial diet*) dapat juga digunakan pada uji antibiosis ini. Antibiosis ditentukan dengan mengukur persentase mortalitas larva/pupa dan lama perkembangan larva/pupa.

Pada kegiatan ini telah dilakukan bioasai terhadap tanaman kedelai transgenik hasil transformasi dengan gen *proteinase inhibitor (pin)* II generasi R2 di rumah kaca terbatas (FUT) menggunakan larva serangga hama penggerek polong kedelai (*Etiella zinckenella* Tr.). Tujuan pengujian ini adalah untuk mendapatkan tanaman kedelai transgenik R2 yang tahan terhadap penggerek polong.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan bioasai dilaksanakan di rumah kaca dan laboratorium FUT, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan pada tahun anggaran 2001. Pengujian bioasai ini menggunakan sampel polong muda (umur 15-20 hari) tanaman kedelai transgenik R2 dari event TP1 (9 tanaman) dan TP2 (12 tanaman) serta dua tanam-an kedelai varietas Tidar (nontransgenik) sebagai kontrol yang ditanam di rumah kaca FUT.

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

Koleksi Serangga *E. zinckenella*, Tr. di Lapang

Serangga *E. zinckenella* dikumpulkan dari beberapa lokasi lapang melalui survei. Serangga tersebut selanjutnya diperbanyak di laboratorium serangga FUT, Balitbio.

Perbanyak dan Pemeliharaan Serangga

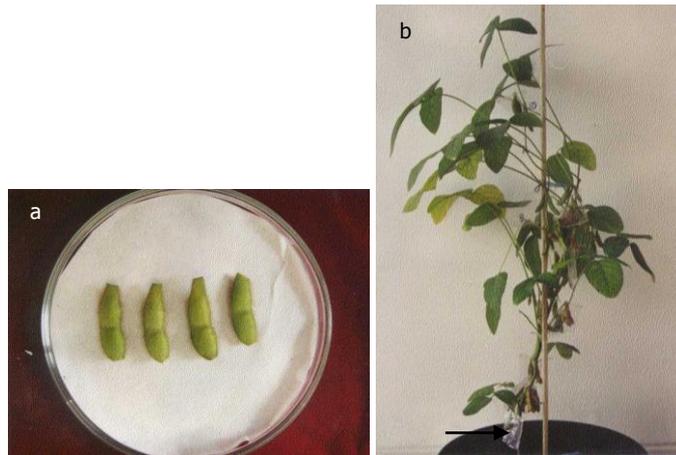
Telur *E. zinckenella* diinfestasikan pada polong kedelai muda dan dibiarkan menetas, setelah 3-4 hari akan menjadi larva di dalam petridish. Stadium larva terdiri dari 5 instar (berkisar 13-18 hari). Larva instar lima dipindahkan dalam serbuk gergaji halus dan akan membentuk pupa di dalam rumah kepompong serbuk gergaji. Stadium pupa berkisar antara 9-15 hari dan akan muncul imago. Imago dipindahkan ke dalam kurungan kasa yang telah diberi polong kedelai yang digantungkan dalam kurungan sebagai medium untuk bertelur. Masa pertumbuhan telur sampai imago (kupu-kupu) berkisar antara 28-41 hari.

Persiapan Tanam

Tanaman kedelai transgenik (R2) dan nontransgenik ditanam dalam pot plastik di 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 Larva *E. zinckenella* pada Polong Kedelai

Setelah tanaman kedelai berumur 50 HST dan berpolong muda (Gambar 1a), sepuluh polong muda disampling (dipilih di tempat yang berbeda) dan diinfestasi dengan larva yang baru menetas (*neonate*) sebanyak 1-3 ekor setiap polong. Polong yang sudah diinfestasi dibungkus dengan kantong plastik bening yang telah diberi lubang dengan jarum (Gambar 1b). Pengamatan dilakukan pada saat menjelang panen. Parameter yang diamati meliputi persentase kerusakan polong, biji, biji sehat, dan jumlah pupa atau imago yang ditemukan.



a. polong kedelai muda umur 20 hari setelah bunga mekar (*anthesis*), b. polong yang telah diinfestasi larva dan dikantongi plastik

Gambar 1. Cara infestasi larva *Etiella* sp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Benih kedelai transgenik dipilih dari biji sehat hasil bioasai tanaman kedelai event TP1 dan TP2 generasi R1 (TP1 dan TP2 merupakan event tanaman hasil penembakan gen *pinII* pada varietas Tidar). Sebanyak 21 tanaman Tidar *pinII* (TP1 = 9 tanaman dan TP2 = 12 tanaman) dan dua pot tanaman kontrol telah dibioasai secara langsung (*in vivo*) dengan larva *E. zinckenella* Tr. di rumah kaca FUT.

Hasil bioasai 21 pot kedelai Tidar *pinII* (TP1 dan TP2) terhadap hama penggerek polong menunjukkan bahwa persentase mortalitas larva berkisar antara 50-90% dengan rata-rata 76,9%, sedangkan ukuran larva yang hidup berkisar antara 3,6-7 mm dengan rata-rata 5,1 mm. Persentase biji sehat antara 35-70% dengan rata-rata 57,7% dan persentase biji terserang berkisar antara 30-65% dengan rata-rata 42,3% (Tabel 1). Hasil bioasai polong kedelai varietas Tidar, TP1, dan TP2 terhadap hama penggerek polong disajikan pada Tabel 2. Polong yang terserang oleh larva ditandai dengan adanya lubang gerek dan butir-butir kotoran kuning atau coklat muda yang terikat satu sama lain oleh benang pintal. Serangan pada biji Tidar *pinII* hanya berupa gerek sedikit sedangkan pada Tidar non *pinII* sepertiga, setengah, dan bahkan habis sama sekali (Gambar 2). Larva yang hidup pada Tidar *pinII* ukurannya lebih pendek jika dibandingkan dengan larva yang hidup pada Tidar *pinII* dan berwarna putih pucat.

Serangga dari ordo Lepidoptera tergantung pada serine proteinase (trypsin, chymotrypsin, dan estalase) sebagai proteinase utama untuk mendapatkan asam amino dari protein yang dimakannya. Pada usus tengah

(midgut) serangga dari ordo Lepidoptera umumnya mempunyai pH 9-11 (alkali), di mana pH ini merupakan pH optimal untuk serine proteinase. Salah satu enzim pencernaan di dalam midgut serangga adalah enzim proteinase. Enzim proteinase ini mengkatalisis pemecahan protein yang dimakan oleh serangga untuk mendapatkan asam amino yang penting untuk pertumbuhan serangga normal. *PinII* mempunyai efek negatif terhadap pertumbuhan serangga dari ordo Lepidoptera dengan jalan menginaktifkan enzim proteinase yang ada di dalam midgut serangga (Bahagiawati, 2000).

Tabel 1. Hasil bioasai polong kedelai varietas Tidar R2 hasil transformasi gen *pinII* dengan penembakan terhadap hama penggerek polong *E. zinckenella*

Tanaman	Mortalitas larva (%)	Ukuran larva hidup (mm)	Biji sehat (%)	Biji terserang (%)
Tidar <i>pinII</i>	50-90	3,6-7	35-70	30-65
(TP1 dan TP2)	(76,9)	(5,1)	(57,7)	(42,3)
Tidar non <i>pinII</i>	25-30	9,2-9,7	5-10	90-95
	(27,5)	(9,45)	(7,5)	(92,5)

Angka di dalam kurung adalah nilai rata-rata

Tabel 2. Hasil bioasai polong kedelai varietas Tidar, TP1, TP2 (R2) terhadap penggerek polong *E. zinckenella* Tr

Kode tanaman	Mortalitas larva (%)	Ukuran larva hidup (mm)	biji sehat (%)	biji terserang (%)
Tidar non <i>pinII</i>				
KT 1	30	9,2	10	90
KT 2	25	9,7	5	95
Kisaran	25-30	9,2-9,7	5-10	90-95
Rata-rata	(27,5)	(9,45)	(7,5)	(92,5)
Tidar <i>pinII</i>				
TP 1-1 (9)	75	5,5	70	30
TP 1-1 (3)	70	5,5	65	35
TP 1-1 (5) a	75	5,4	50	50
TP 1-1 (5) b	75	4,8	70	30
TP 1-1 (5) c	70	5,1	50	50
TP 1-1 (1) a	70	5,5	65	35
TP 1-1 (1) b	70	3,8	65	35
TP 1-1 (4) a	60	5,6	40	60
TP 1-1 (4) b	70	6,3	60	40
TP 2-3 (9) a	80	4,7	55	45
TP 2-3 (9) b	90	5,5	60	40
TP 2-3 (1)	80	6,5	60	40
TP 2-1 (4)	75	4,4	65	35
TP 2-4 (6)	70	3,6	65	35
TP 2-4 (2) a	80	5,2	65	35
TP 2-4 (2) b	80	4	45	55
TP 2-1 (2)	70	4,6	65	35
TP 2-4 (9)	85	5,6	45	55
TP 2-1 (6)	85	7	60	40
TP 2-2 (4)	55	4,6	35	65
TP 2-4 (7)	50	5,5	55	45
Kisaran	50-90	3,6-7	35-70	30-65
Rata-rata	(76,9)	(5,1)	(57,7)	(42,3)



Gambar 2. Hasil bioasai pada polong dan biji kedelai Tidar *pinII* dan kontrol

Ryan (1990) dan Jhonson *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 tingkat penghambatan pencernaan proteinnya tinggi. Sedangkan menurut Hilder *et al.* (1987), transformasi tanaman dengan proteinase inhibitor yang telah dilakukan adalah serine proteinase inhibitor sebagai contoh pada transformasi tanaman tembakau dengan gen cowpea trypsin inhibitor yang menghambat pertumbuhan serangga *Heliothis virescens*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil pengujian bioasai tanaman kedelai varietas Tidar R2 dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Mortalitas rata-rata larva Tidar *pinII* tinggi (76,9%) dibandingkan dengan Tidar non *pinII* (rata-rata 27,5%).
2. Perkembangan larva dilihat dari rata-rata panjang tubuh larva yang hidup pada Tidar *pinII* lebih rendah (5,1 mm) jika dibandingkan larva yang hidup pada Tidar non *pinII* (9,45 mm).
3. Persentase rata-rata biji sehat Tidar *pinII* lebih tinggi (57,7%) jika dibandingkan dengan Tidar non *pinII* (rata-rata 7,5%) dan persentase rata-rata biji terserang pada Tidar *pinII* jauh lebih rendah (42,3%) jika dibandingkan dengan Tidar non *pinII* (rata-rata 92,5%).

Saran

Mengingat masih terdapat variasi ketahanan tanaman kedelai transgenik terhadap *E. zinckenella* yang cukup besar baik antara individu tanaman maupun dalam satu individu, maka hasil uji bioasai ini masih perlu

dilanjutkan pada generasi tanaman berikutnya, terutama ditujukan pada hasil-hasil kedelai transgenik yang sehat.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahagiawati. 2000.** Peranan dan potensi *diatery insectisidal* protein dalam rekayasa genetika tanaman tahan hama. Buletin AgroBio 3(2):74-79.
- 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 *Maduca sexta* larvae. Natl. Acad. Sci. 86:9871-9875.
- Ryan, C.A. 1990.** Proteinase inhibitor in plant: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Rev. Phytopath. 28:425-449.