

# PENINGKATAN KETAHANAN KACANG HIJAU TERHADAP HAMA GUDANG *Callosobruchus chinensis*: DARI PENDEKATAN KONVENSIONAL MENUJU BIOTEKNOLOGI

## Musalamah

### ABSTRAK

Hama *Callosobruchus chinensis* menyebabkan kerusakan pasca panen yang serius pada komoditas kacang hijau. Perbaikan ketahanan kacang hijau terhadap hama *C. chinensis* telah lama dilakukan namun belum memberikan hasil yang memuaskan. Penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi gen-gen baru pada tanaman yang memberi ketahanan terhadap hama bruchus, mendapatkan beberapa kandidat gen yang berasal dari senyawa pelindung, yang dapat berupa senyawa *proteic* maupun *aproteic*. Penemuan senyawa metabolit sekunder pada tanaman yang bersifat insektisidal terhadap hama bruchus (khususnya amylase inhibitor, protease inhibitor, lektin, dan visilin) membuka peluang dilakukannya teknik transformasi gen, khususnya gen pengendali faktor ketahanan terhadap hama *C. chinensis* (seperti  $\alpha$ -AI-1). Keberhasilan transformasi gen pengendali  $\alpha$ -AI pada kacang merah maupun kacang polong menunjukkan bahwa transfer gen ke dalam spesies legum lain seperti kacang hijau memungkinkan untuk dilakukan. Dengan adanya ekspresi gen pengendali protein inhibitor pada biji kacang hijau maka kerusakan akibat serangan hama *C. chinensis* dapat diperkecil.

Kata kunci: ketahanan hama, kacang hijau, *Callosobruchus chinensis*, konvensional, bioteknologi

### ABSTRACT

**Resistance improvement to *Callosobruchus chinensis* in mungbean: from conventional to biotechnology approach.** *Callosobruchus chinensis* cause serious post-harvest damage in mungbean. Breeding is improving resistance to *C. chinensis* in mungbean has been conducted for a long time, but it hasn't showed satisfactory result. In the continuous search for new plant genes that confer resistance against bruchids, some interesting candidates have been found in defence compound, which may be *proteic* or *aproteic*. The discovery of some secondary metabolit

compounds in some Leguminous crops (e.g. amylase inhibitor, protease inhibitor, lectins, and visilins) available to apply gene transfer, especially gene coding defence resistance to *C. chinensis* ( $\alpha$ Amylase Inhibitor/ $\alpha$ AI). The successfulness of gene coding  $\alpha$ AI transfer in Azuki bean and pea indicate that the transfer of  $\alpha$ AI gene to mungbean could also to be conducted. The  $\alpha$ AI expression in mungbean seed could avoid damage of *C. chinensis* infestation.

Keywords: insect resistance, mungbean, *Callosobruchus chinensis*, conventional, biotechnology

### PENDAHULUAN

Penyimpanan bahan pangan dan bahan tanam merupakan tahap akhir dari rangkaian sistem produksi tanaman yang seringkali dihadapkan pada permasalahan serangan hama gudang. Hama gudang yang mempunyai potensi bernilai ekonomis merugikan pada penyimpanan adalah kelompok *bruchus*. Larva *bruchus* berkembang dan menyebabkan kerusakan pada beberapa biji leguminosae/kacang-kacangan: kacang merah (*Vigna angularis*), kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), kacang hijau (*Vigna radiata*) dan kadang-kadang ditemukan pula pada kedelai (*Glycine max*), pea (*Pisum sativum*) dan kacang faba (*Vicia faba*) (Ishii 1952, Applebaum *et al.* 1969, Applebaum *et al.* 1970, Janzen 1976 *cit* Ishimoto *et al.* 1996).

Gai (1993) melaporkan kerusakan oleh kumbang *C. chinensis* pada genotip kacang hijau rentan mencapai 80–90%, sedang pada genotip tahan sebesar 2,4%–14,3%. Gugar dan Yadaf (1978) melaporkan kehilangan 55–69% dari berat biji dan 45,6–66,3% kandungan protein pada kacang hijau akibat infestasi hama *bruchus*.

Berbagai upaya pengendalian larva *bruchus* telah banyak dilakukan di antaranya pengendalian dengan perlakuan pada benih (*seed treatment*), baik dengan menggunakan senyawa kimia seperti NaOH (Sarikarin *et al.* 1999), insektisida, bahan nabati seperti ekstrak tanaman mimba (*Azadirachta indica*) (Dreyer dan Echo Staff 1984, Ahmed dan Kopel 1986, Maina dan Lale 2004),

<sup>1</sup> Peneliti Pemuliaan Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Kotak Pos 66 Malang 65101, Telp. (0341) 801468, e-mail: blitkabi@telkom.net

senyawa aromatik tanaman dan komponen volatilnya seperti menthone, trans-geraniol, sitronella dan linalol (Nakahara *et al.* 2005), atau menjemur benih selama tiga hari di bawah sinar matahari (Dharmasena 1989). Upaya di atas seringkali tidak efektif, mempengaruhi kesehatan manusia, dan biaya tinggi. Painter (1951) mengungkapkan bahwa penggunaan tanaman tahan dinilai ideal untuk melindungi tanaman dari serangan hama. Tulisan ini merangkum perkembangan pendekatan pemuliaan untuk memperbaiki ketahanan kacang hijau terhadap hama *C. chinensis* baik melalui pendekatan secara konvensional hingga peluang pemanfaatan bioteknologi.

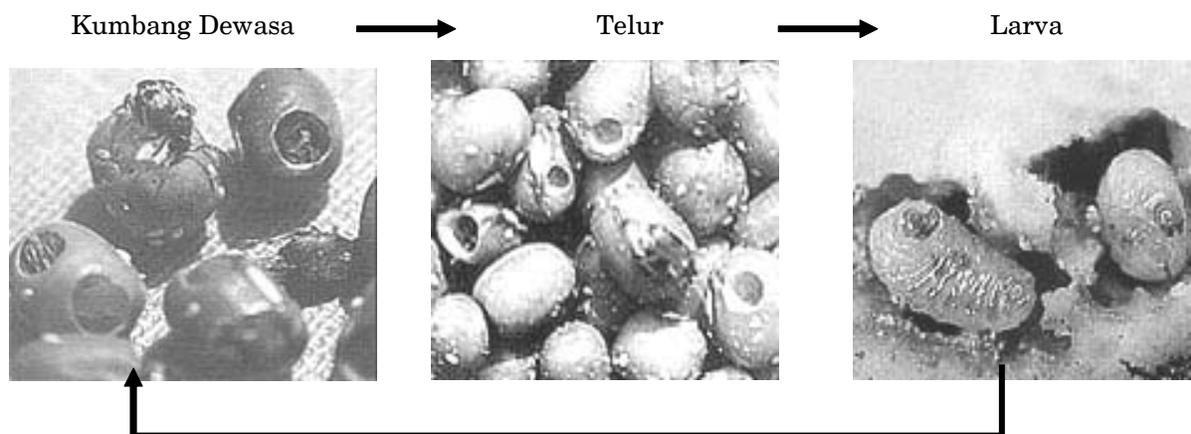
### BIOLOGI HAMA GUDANG *C. chinensis*

Siklus hidup *C. chinensis* dimulai sejak telur diletakkan sampai menjadi imago dan meletakkan telur lagi. Telur menetas 4–8 hari. Larva dari telur yang baru menetas langsung menggerek masuk ke dalam biji. Lama masa larva menjadi pupa berkisar antara 10–13 hari. Imago selama beberapa hari tetap berada dalam biji selama 3–5 hari. Masa kopulasi berkisar antara 5–8 hari (Talekar 1988). Imago betina yang keluar dari biji akan bertelur setelah berkopulasi. Imago yang tidak berkopulasi tidak bertelur. Daur hidup *C. chinensis* antara 21–31 hari.

Masa kumbang hidup sangat dipengaruhi oleh aktivitas biologis selama hidupnya, kumbang yang tidak pernah berkopulasi selama hidupnya mampu bertahan hidup 4 hari lebih lama dibandingkan yang berkopulasi sedangkan kumbang betina yang tidak pernah berkopulasi dapat bertahan hidup antara 4–11 hari. Dari kisaran jumlah telur yang diletakkan oleh *C. chinensis* betina, fertilitas rata-rata 86,5% (Slamet *et al.* 1985).

*C. chinensis* memiliki telur berbentuk lonjong, transparan dan berwarna kuning. Masa inkubasi telur berlangsung antara 4–5 hari. Larva berwarna kuning jernih dengan kepala berwarna coklat dan mengalami pergantian kulit hingga menjadi pupa. Pupa berwarna putih kekuningan menyerupai serangga dewasa tetapi semua bagian tubuhnya masih menyatu. Imago mula-mula berwarna putih kekuningan pada bagian bakal kepala terbentuk bintik-bintik coklat yang makin lama menjadi banyak dan berubah menjadi hitam. Kumpulan bintik ini akan menjadi mata majemuk. Kemudian seluruh badannya dimulai dari kepala secara perlahan-lahan berubah menjadi coklat.

Bentuk tubuh imago jantan lebih kecil dari pada imago betina. Imago yang telah tumbuh sempurna dan siap melakukan kopulasi keluar dari biji kacang hijau melalui jendela berbentuk lingkaran yang telah disiapkan sebelumnya pada saat masih berbentuk larva (Slamet *et al.*, 1985).



Gambar 1. Fase Hidup *C. chinensis* (AVRDC 2001 )

## PROGRAM PEMULIAAN KACANG HIJAU TAHAN *C. chinensis* SECARA KONVENSIONAL

Ketahanan tanaman terhadap hama dibedakan menjadi ketahanan ekologi dan genetik (Kogan 1982). Beberapa ahli tidak mengakui adanya ketahanan ekologi, karena sifatnya yang tidak tetap, sedangkan ketahanan genetik relatif stabil dan temurun. Painter (1958) membagi mekanisme ketahanan ke dalam tiga kategori yakni non-preferensi, antibiosis, dan toleran. Sedang Hanover (1975) mengusulkan empat dasar mekanisme ketahanan tanaman yakni:

1. Morfologi dan anatomi inang,
2. Senyawa kimia penolak (*chemical repellents*) hama yang dihasilkan oleh inang,
3. Senyawa pemikat (*chemical attractants*) hama yang dihasilkan oleh inang,
4. Status nutrisi inang.

Preferensi dan non-preferensi adalah respon hama terhadap tanaman yang tidak memiliki karakter untuk dijadikan inang baik sebagai makanannya, peletakan telur, tempat berlindung atau kombinasi ketiganya. Non-preferensi disebut juga antixenosis (Kogan dan Ortman 1978 *cit* Singh 1986). Beberapa faktor yang berhubungan dengan preferensi hama antara lain kebiasaan hama, respon hama terhadap warna dan intensitas sinar, struktur fisik dan permukaan tanaman, adanya senyawa kimia yang dihasilkan inang, serta struktur morfologi tanaman seperti rambut pada permukaan jaringan, kulit yang keras dan tebal, yang dapat berperan sebagai penghalang bagi herbivora yang memilih inang yang sesuai (Teetes 1996).

Antibiosis adalah salah satu mekanisme ketahanan tanaman terhadap serangga yang dapat disebabkan oleh pengaruh fisiologis, akibat serangga makan tanaman, baik bersifat sementara maupun untuk waktu yang lama. Di antara gejala umum yang dapat dilihat adalah: (1) kematian larva pada stadia awal, (2) kecepatan tumbuh yang menyimpang (misalnya makin lambat), (3) kegagalan sistem pencernaan, (4) gagal menjadi kepompong, (5) kegagalan perkembangan menjadi serangga dewasa, (6) ukuran tubuh tidak normal, dan (7) menurunnya kesuburan dan keperidian (Singh 1986). Ketahanan tanaman terhadap hama tertentu diatur oleh faktor genetik

dan dapat dimanfaatkan dalam pembentukan varietas unggul melalui ketahanan antibiosis (Sumarno 1992). Tipe ketahanan lain, seperti penghindaran, antixenosis, dan toleran umumnya kurang efektif sebagai sumber ketahanan guna perbaikan varietas unggul.

Program pemuliaan untuk menghasilkan varietas kacang hijau tahan terhadap serangan hama *C. chinensis* telah dilakukan AVRDC sejak tahun 1979 (Tabel 1). Berbagai tahap pemuliaan untuk merakit varietas tahan dimulai dari skrining untuk mendapatkan genotipe tahan, melakukan persilangan secara konvensional, dan diikuti seleksi galur. Di samping itu juga dilakukan kajian untuk mengetahui faktor penentu ketahanan tanaman kacang hijau terhadap serangan hama tersebut. Pada tahun 1990an kegiatan mulai mengarah pada pemanfaatan penanda molekuler untuk mengetahui genotipe homozigot.

Studi mekanisme ketahanan antixenosis terhadap hama gudang pada kacang hijau telah banyak dilaporkan. Karakter morfologi biji kacang hijau seperti warna kulit biji, tekstur permukaan biji, ukuran biji, dan kekerasan biji, dilaporkan mempengaruhi preferensi serangan hama *C. chinensis* (Talekar dan Lin 1981; AVRDC 1986; Marwoto 1987, Anwari *et al.* 2004). Terdapat indikasi bahwa hama *C. chinensis* lebih menyukai kacang hijau berbiji besar, permukaan biji yang mengkilap lebih disukai dari pada yang kusam.

Hingga tahun 2005 telah dilepas 19 varietas kacang hijau di Indonesia, baik yang dihasilkan oleh pemulia tanaman dari balai penelitian (Balitkabi), maupun pemulia tanaman dari institusi lain (Perguruan tinggi). Varietas-varietas tersebut memiliki karakter morfologi biji yang beragam, 12 varietas memiliki permukaan kulit biji mengkilap dan 14 varietas bijinya berukuran besar (5–7 g/100 biji) (Suhartina 2005). Biji berukuran besar dan mengkilap cukup disukai oleh konsumen. Sementara dilaporkan bahwa kedua karakter biji tersebut juga disukai *C. chinensis*. Oleh karena itu diperlukan upaya-upaya pendekatan genetik untuk mendapatkan kacang hijau tahan *C. chinensis*.

Menurut Johnson (1982) daya tahan yang diharapkan dalam konsep PHT untuk menghadapi penyakit ialah yang mampu bertahan lama yang disebut sebagai ketahanan langgeng

(*durable resistance*) yaitu ketahanan varietas yang tetap efektif walaupun ditanam terus-menerus pada daerah endemik penyakit bersangkutan. Oka (2005) menganggap definisi ini berlaku juga terhadap hama. Penggunaan varietas tahan hama yang langgeng merupakan

salah satu strategi pengendalian yang tidak mencemari lingkungan, kompatibel dengan strategi pengendalian yang lain, dapat digabungkan dengan persyaratan-persyaratan agronomi, lebih mantap dan murah bila dibandingkan dengan pestisida.

**Tabel 1. Rangkaian kegiatan penelitian untuk mendapatkan genotip kacang hijau tahan *C. chinensis* di AVRDC.**

Tahun	Kegiatan	Hasil
1979–1980	Skrining asesi plasma nutfah <i>Vigna mungo</i>	Diperoleh asesi moderat resisten yakni VM2011 dan VM2164
1981–1982	Persilangan dengan teknik silang-balik	Diperoleh galur-galur generasi lanjut
1983–1985	Seleksi populasi bersegregasi	Diperoleh 40 galur yang memperlihatkan derajat ketahanan yang berbeda yang selanjutnya ditanam di lapang untuk disilangbalikkan guna mendapatkan kacang hijau hasil tinggi dan tahan hama bruchus; V4997 dikonfirmasi lebih lanjut karakter ketahanannya apakah benar-benar tahan.
1986	Mengkaji oviposisi dari <i>C. chinensis</i> berdasarkan ukuran biji, warna biji, keadaan kulit biji, dan pengaruh <i>seed treatment</i> yaitu pencucian biji dengan detergen Hexan.	Diketahui bahwa <i>C. chinensis</i> L. lebih suka meletakkan telurnya pada biji yang besar. Kulit biji berwarna kuning lebih disukai daripada hijau dan hitam. Kulit biji mempunyai peranan dalam menstimulasi oviposisi; Preferensi oviposisi akan distimulasi oleh adanya stimulan oviposisi atau tidak adanya perlakuan detergen Hexane
1987	Skrining ketahanan galur-galur dengan generasi lanjut terhadap <i>Callosobruchus chinensis</i> Skrining populasi BC <sub>1</sub> F <sub>5</sub> dan BC <sub>1</sub> F <sub>6</sub> untuk ketahanan terhadap <i>C. chinensis</i> Mengkaji sumber ketahanan terhadap <i>C. chinensis</i>	Diperoleh lima galur tahan VC1535-11-1-B-1-3-B, VC2764-B-7-2-B, VC2764-B-7-1-B, VC1209-3-B-1-2-B, dan VC1482-C-12-2-B Persilangan antar spesies <i>Vigna</i> diketahui memiliki ketahanan. Satu asesi <i>V. glaberescens</i> yang tahan lalat bibit (V1160) juga juga memperlihatkan ketahanan terhadap <i>C. chinensis</i> . Beberapa asesi dikaji untuk mengetahui mekanisme ketahanan terhadap <i>C. chinensis</i>
1988	Skrining 500 asesi kacang hijau	10 asesi teklasifikasi sangat tahan, dua asesi (V2802B-G dan V1128B-BL) terklasifikasi tahan dengan indikasi tidak ditemukannya kumbang <i>C. chinensis</i> L; V280, V2802B-G dan V1128B-BL berbiji kecil. Biji dari ketiga asesi tersebut diperbanyak untuk konfirmasi mekanisme ketahanan untuk selanjutnya digunakan dalam program pemuliaan kultivar kacang hijau tahan <i>C. chinensis</i> .
1989	Karakterisasi mekanisme ketahanan terhadap <i>C. chinensis</i> pada asesi V2709, V2802, dan VM2164 dengan VC1973A digunakan sebagai cek rentan.  Skrining keturunan <i>backcross</i> <i>V. glaberescens</i> x <i>V. radiata</i> terhadap <i>C. chinensis</i>	Biji dan polong ketiga asesi ditemukan telur <i>C. chinensis</i> lebih sedikit dari pada cek rentan. Ukuran biji kecil pada asesi tahan bukan merupakan faktor ketahanan yang utama. Pada VM2164 diketahui mekanisme ketahanannya adalah antibiosis. Semua galur rentan diindikasikan dengan adanya telur pada semua biji dan kumbang dewasa sebanyak 1-3.

Tabel 1. Lanjutan.

Tahun	Kegiatan	Hasil
1990	Skrining galur-galur tahan <i>C. chinensis</i> hasil persilangan galur <i>V. radiata</i> (hasil tinggi) x <i>V. radiata</i> (tahan <i>C. chinensis</i> ) dan galur <i>V. radiata</i> (hasil tinggi) x <i>V. sublobata</i> (tahan <i>C. chinensis</i> ) Mengisolasi faktor ketahanan	Tidak ada perbedaan yang tampak di antara persilangan ketika lima tetua rentan yang berbeda digunakan sebagai tetua jantan maupun betina. V2709 memiliki derajat ketahanan tertinggi yang tampak pada keturunan F <sub>2</sub> nya. Hasil persilangan asesi <i>V. sublobata</i> (TC1966) memperlihatkan tetua rentan sangat rusak sebaliknya tetua tahan tidak. % kerusakan F <sub>2</sub> berada diantara dua tetua. Tidak ada perbedaan yang tampak ketika tetua tahan dijadikan jantan atau pun betina. Hasil analisis biologis pada genotipe tahan V2709 dan V2802 serta VM2164 memperlihatkan bahwa faktor ketahanan genotipe tersebut berdasarkan mekanisme antibiosis. Hasil analisis biji di CIAT menemukan bahwa <i>archelin</i> , protein yang memberikan efek tahan terhadap <i>C. chinensis</i> pada biji <i>Phaseolus vulgaris</i> , merupakan faktor ketahanan kacang hijau terhadap <i>C. chinensis</i> . Arcelin ini kemudian diisolasi.
1991–1993	Seleksi galur homozigot tahan bruchus dari populasi F <sub>3</sub> BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> dengan penanda RFLP Identifikasi tanaman bruchus dengan dua penanda	Probe R26 dan M371 menunjukkan polymorfisme yang cukup tinggi dan diketahui bahwa 15 galur F <sub>3</sub> BC <sub>2</sub> S <sub>1</sub> hasil persilangan TC1966 (tahan <i>C. chinensis</i> ) x VC3809A (rentan <i>C. chinensis</i> ) merupakan genotipe homozigot. R26 dan A315, berada 10 dan 30 cM dari gen ketahanan, dapat digunakan sebagai pelacak untuk menyeleksi tanaman tahan bruchus.

Sumber: diolah dari AVRDC Progress Report (1984; 1986; 1987; 1988; 1989; 1990; 1993)

### SENYAWA METABOLIT SEKUNDER : LANGKAH AWAL MENUJU REKAYASA GENETIK

Antibiosis adalah salah satu mekanisme ketahanan tanaman terhadap serangga yang dapat disebabkan oleh pengaruh fisiologis, akibat serangga makan tanaman, baik bersifat sementara maupun untuk waktu yang lama. Diantara gejala umum yang dapat dilihat adalah: (1) kematian larva pada stadia awal, (2) kecepatan tumbuh yang menyimpang (misalnya makin lambat), (3) kegagalan sistem pencernaan, (4) gagal menjadi kepompong, (5) kegagalan perkembangan menjadi serangga dewasa, (6) ukuran tubuh tidak normal, (7) menurunnya kesuburan dan keperidian (Singh 1986). Ketahanan tanaman terhadap hama tertentu diatur oleh faktor genetik dan dapat dimanfaatkan dalam pembentukan varietas unggul melalui ketahanan antibiosis (Sumarno 1992). Tipe ketahanan lain, seperti penghindaran,

antixenosis, dan toleran umumnya kurang efektif sebagai sumber ketahanan guna perbaikan varietas unggul.

Mekanisme ketahanan tanaman terhadap hama dapat dilakukan dengan memproduksi senyawa kimia baik yang bersifat *aproteic* (seperti antibiotik, alkanoid, terpen, glukosida sianogenik) maupun *proteic* (seperti Chitinase,  $\beta$ -1,3-glukanol, Lectin, Arcelin, Vicilin, Sistemina dan enzim inhibitor). Senyawa sekunder yang terdapat pada biji kacang-kacangan, yang dilaporkan terbukti memiliki peran pelindung terhadap serangan hama bruchus adalah *saponin* (Ishii 1952, Applebaum *et al.* 1969), *heteropolysakarida* (Applebaum *et al.* 1970) dan *lektin* (Janzen *et al.* 1976, Gatehouse *et al.* 1984).

Biji kacang hijau yang memiliki mekanisme antibiosis terhadap hama *C. chinensis* dilaporkan terkait dengan beberapa senyawa protein yaitu *arcelin* (AVRDC 1986),  $\alpha$ -Amylase Inhibitor /  $\alpha$ AI

(Ishimoto *et al.* 1996), dan *VrD1* (Lin *et al.* 2005). Piergiovanni *et al.* (1990) melaporkan senyawa trypsin inhibitor *palmitic*, *linoleic*, dan *linolenic* berperan sebagai komponen utama yang terkandung dalam kacang tunggak tahan terhadap *C. maculatus*, sedangkan senyawa *arachidic*, *stearic*, dan *behenic* muncul dalam jumlah kecil.

Senyawa *arcelin* dilaporkan terdapat pada biji beberapa genotipe liar *Phaeolus vulgaris* dan diketahui memberikan andil ketahanan tinggi terhadap hama kumbang bubuk *Zabrotes subfasciatus* (Osborn *et al.* 1988 dalam Goossen 1999). Gen *arcelin* secara genetik mempunyai tautan yang dekat dengan gen pengendali phytohemagglutinin dan  $\alpha$ -Amylase Inhibitor.

Enzim inhibitor pada tanaman mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amylase dan proteinase dalam usus serangga. Kedua enzim tersebut diperlukan serangga untuk memproduksi karbohidrat dan protein, di mana hama *C. chinensis* diketahui sangat tergantung pada karbohidrat untuk mensuplai energinya. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada buncis diketahui merupakan faktor ketahanan alami terhadap serangan spesies bruchus (Ishimoto dan Kitamura 1988, Huesing *et al.* 1991). Menurut Morton *et al.* (2000) tiap-tiap protein inhibitor memiliki efektivitas yang berbeda terhadap serangga maupun mamalia. Pada buncis setidaknya ada dua macam  $\alpha$ -Amylase Inhibitor yang telah diketahui berperan sebagai faktor ketahanan alami pada tanaman, yaitu  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1 dan  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-2.  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1 yang ditemukan pada buncis diketahui mampu menghambat kerja

enzim  $\alpha$ -Amylase pada usus larva *C. chinensis* dan *C. maculatus*, tetapi tidak pada *Zabrotes subfasciatus*. Adapun  $\alpha$ -Amylase pada usus larva *Zabrotes subfasciatus* dapat dihambat oleh  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-2.

Pada tingkat tertentu  $\alpha$ -Amylase Inhibitor dalam biji cukup menghambat perkembangan larva dari spesies bruchus. Oleh karena itu  $\alpha$ -Amylase Inhibitor merupakan kandidat yang ideal sebagai sarana perlindungan biji tanaman kacang-kacangan terhadap serangan bruchus. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang diketahui sebagai kandidat gen pengendali ketahanan terhadap hama bruchus tertera pada Tabel 2.

Franco *et al.* (2002) merangkum informasi tentang  $\alpha$ -Amylase serangga,  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada tanaman, dan interaksi dari kedua senyawa tersebut. Kajian terhadap interaksi kedua senyawa di atas menunjukkan bahwa penggunaan tanaman transgenik memberikan hasil positif dan berpeluang digunakan sebagai salah satu cara untuk menekan infestasi hama *C. chinensis*. Penemuan protein yang bersifat toksik terhadap hama ini membuka peluang dilakukannya rekayasa genetik melalui transformasi gen.

#### PELUANG TRANSFORMASI GEN UNTUK KETAHANAN KACANG HIJAU TERHADAP *C. chinensis*

Pestisida dan varietas tahan merupakan sarana untuk melindungi tanaman budidaya dari gangguan hama. Karena alasan ekonomi, penggunaan pestisida menjadi terhambat, sedang usaha perakitan tanaman tahan hama secara

**Tabel 2. Kandidat gen pengendali ketahanan terhadap hama bruchus.**

Protein	Bentuk/ aksi mekanismenya
Visilin pada kacang tunggak $\alpha$ -Amylase Inhibitor	Mengikat senyawa kitin hama Menghambat kerja enzim $\alpha$ -Amylase pada usus serangga
Protease Inhibitor pada kacang tunggak, seperti sistein, Bowman-Birk, tripsin, simotripsin inhibitor	Pengurangan asam amino esensial yang dihasilkan dari hipersekresi digesti enzim, menghambat digesti protease pada hama, mengikat karbohidrat pada membran ephitelium atau peritropik usus serangga
Senyawa lektin	Mempertahankan dari proteolisis

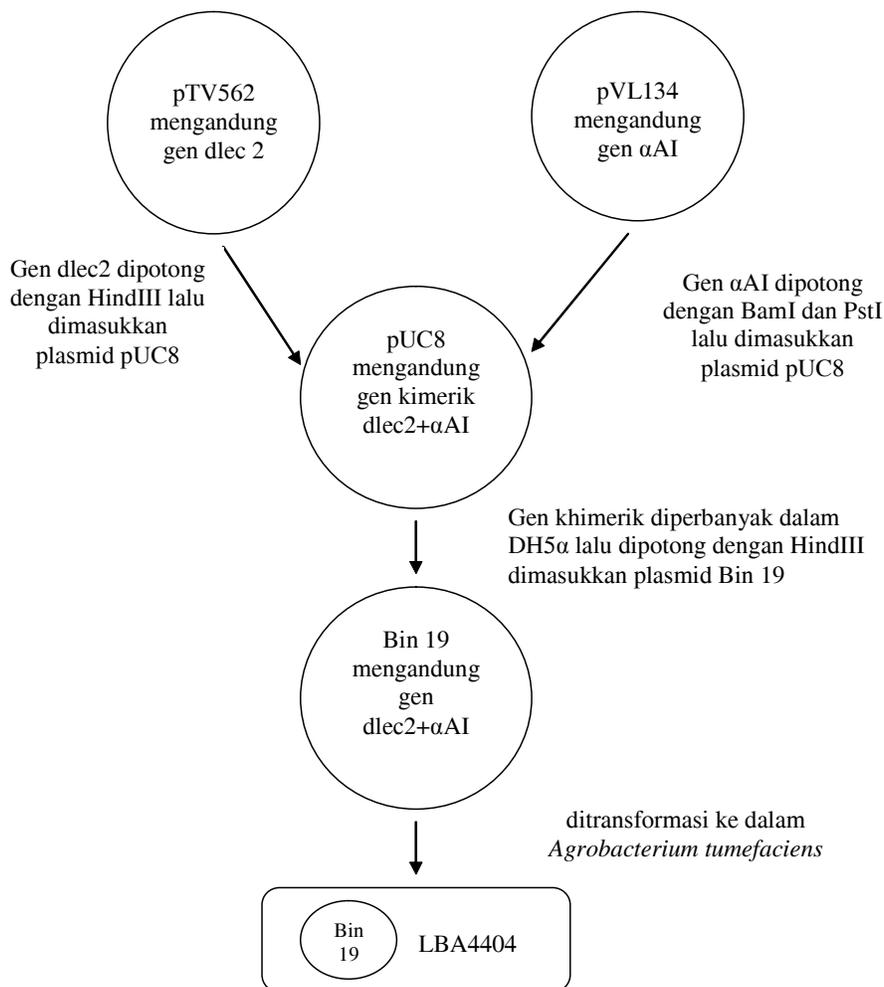
Sumber: Machuka (2000).

konvensional terbatas oleh kompatibilitas antara tanaman yang akan dimuliakan dengan sumber-sumber gen resistensi yang ingin dimasukkan, yang kerap kali ditemukan pada organisme lain. Rekayasa genetik telah membuka peluang untuk mengatasi keterbatasan tersebut. Sejak dikembangkannya vektor plasmid Ti dari *Agrobacterium tumefaciens*, telah berhasil dilakukan transfer gen-gen resistensi dari organisme lain (mikro-organisme ataupun tanaman lain) ke dalam tanaman budidaya. Bagi pemuliaan tanaman, teknologi ini menguntungkan karena sumber gen resistensi dapat berasal dari organisme yang tak terbatas.

Secara sederhana Brown (1990) menguraikan tahapan perakitan tanaman transgenik yaitu: (1) isolasi gen atau DNA target yang membawa sifat

tertentu dari bakteri tertentu atau tanaman lain yang mempunyai sifat yang diinginkan, (2) ligasi DNA target ke dalam vektor sehingga terbentuk DNA rekombinan, (3) transformasi vektor (DNA rekombinan) pada bakteri tertentu dengan tujuan untuk memperbanyak kopi DNA rekombinan, dan (4) penyisipan vektor dan DNA target ke dalam sel tanaman yang dikehendaki yang tidak mempunyai sifat tersebut.

Dengan menggunakan teknologi rekayasa genetik Shade *et al.* (1994) dan Schroeder *et al.* (1995) berhasil mengekspresikan gen penyandi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada biji kacang polong (*Pisum sativum*). Sementara Ishimoto *et al.* (1996) berhasil mengekspresikan gen penyandi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada kacang merah (*Vigna unguiculata*) dengan menggunakan promoter phyto-



Gambar 2. Isolasi gen, konstruksi plasmid rekombinan dan transformasi  $\alpha$ AI dalam *Agrobacterium tumefaciens* (Sumber: diolah dari Ishimoto *et al.* 1996)

hemagglutinin (PHA). Proses transformasi gen penyandi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada kacang merah secara sederhana dijelaskan dalam Gambar 2.

*A. tumefaciens* yang telah mengandung plasmid rekombinan selanjutnya diinfeksi pada sel tanaman. Dalam tahap ini, digunakan sel tanaman hasil regenerasi organogenesis, yaitu epikotil, yang berasal dari biji yang ditumbuhkan secara *in vitro*. Menurut Chandra dan Pental (2003) pada kebanyakan tanaman kacang-kacangan bahan tanaman yang akan ditransformasi merupakan hasil regenerasi organogenesis. Epikotil yang dipotong-potong sepanjang 10 mm dicelupkan dalam suspensi *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 selama 15 menit supaya bakteri menginfeksi sel tanaman. Epikotil yang telah terinfeksi *A. tumefaciens* tersebut selanjutnya dikulturkan pada media Murashige & Skoog (MS) dengan kanamisin hingga berkembang menjadi tanaman dan menghasilkan biji. Kemudian dengan menggunakan *bioassay* diuji aktivitas senyawa  $\alpha$ -Amylase Inhibitor yang terkandung dalam biji kacang merah transgenik tersebut. Di samping itu kuantitas senyawa  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada biji kacang merah transgenik yang sudah homozigot juga diukur untuk mengetahui seberapa besar kemampuan ekspresi gen  $\alpha$ -Amylase Inhibitor dan bagaimana segregasi pada keturunannya. Diketahui rasio kandungan  $\alpha$ -Amylase Inhibitor pada segregasinya mengikuti perbandingan 3:1 yang menunjukkan bahwa ekspresi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor dikendalikan oleh lokus tunggal dominan.

Hasil transformasi menunjukkan bahwa kacang merah transgenik tersebut ternyata mampu mengakumulasi senyawa  $\alpha$ -Amylase Inhibitor dalam jumlah banyak sehingga biji kacang merah transgenik tersebut dapat terhindar dari serangan tiga spesies bruchus yaitu *C. chinensis*, *C. maculatus*, dan *C. analis*, tetapi tidak terhadap hama *Zabrotes subfasciatus*. Menurut Morton *et al.* (2000) tiap senyawa inhibitor mempunyai efektifitas insektisidal terhadap spesies hama tertentu. Fakta ini memberi penjelasan atas hasil yang diperoleh Ishimoto *et al.* (1996) yang menemukan bahwa kacang merah transgenik yang telah disisipi gen penyandi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor hanya efektif menghalangi aktivitas enzim  $\alpha$ -Amylase dalam usus larva *C. chinensis*, *C. maculatus*, dan *C. analis*. Hal itu

terjadi karena gen penyandi yang disisipkan adalah  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1.

Hasil introgresi gen  $\alpha$ -Amylase Inhibitor sebagai faktor ketahanan ditunjukkan lebih jauh oleh Morton *et al.* (2000) dengan memasukkan gen penyandi  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1 ke dalam kacang polong. Diketahui juga bahwa  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1 efektif dalam menghambat kerja enzim  $\alpha$ -Amylase dalam usus *C. chinensis* yang merupakan hama gudang benih kacang hijau. Temuan ini membuka peluang bagi perakitan tanaman kacang hijau tahan *C. chinensis* melalui rekayasa genetik dengan penyisipan gen pengendali  $\alpha$ -Amylase Inhibitor-1 ke dalam DNA kacang hijau.

Keberhasilan transformasi gen pengendali  $\alpha$ -AI pada kacang merah maupun kacang polong menunjukkan bahwa transfer gen ke dalam spesies legum lain seperti kacang hijau, kacang tunggak, dan kedelai memungkinkan untuk dilakukan. Dengan adanya ekspresi gen pengendali protein inhibitor pada biji-biji tanaman budidaya tersebut maka kerusakan akibat serangan hama bruchus dapat diperkecil.

## KESIMPULAN

1. Pemuliaan ketahanan kacang hijau terhadap hama *C. chinensis* secara konvensional belum menunjukkan hasil yang memuaskan.
2. Pendekatan bioteknologi memberi indikasi bahwa ketahanan antibiosis kacang hijau terhadap hama *C. Chinensis* ditentukan oleh senyawa protein *arcelin*,  $\alpha$ -*Amylase Inhibitor-1*, dan *VrD1* sehingga membuka peluang bagi program pemuliaan kacang hijau tahan *C. chinensis* melalui metode transformasi gen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S. and B. Kopel. 1986. Use of Neem and other botanical materials for pest control by farmers in India. *In* Proceedings of the Third Internat Neem Conf. Nairobi. p. 632–626.
- Anwari, M., R. Iswanto, Y. Afriana, dan N. Rahmasari. 2004. Evaluasi ketahanan beberapa genotipe kacang hijau terhadap hama gudang *Callosobruchus chinensis*. hlm 220–225. *Dalam* Proseding Seminar Teknologi Inovatif Komoditas Kacang-kacangan dan Umbi-umbian.
- Applebaum, S.W., S. Marco, and Y. Birk. 1969. Saponins as possible factors of resistance of legume seed to the attack of insects. *J. of Agric. and Food Chem.* 17: 618–622.

- Applebaum, S.W., U. Tadmor, and H. Podoler. 1970. The effect of starch and of a heteropolysaccharide fraction from *Phaseolus vulgaris* on development and fecundity of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 13: 61–70.
- AVRDC. 1984. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 189–191
- AVRDC. 1986. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 79–87
- AVRDC. 1987. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 59–62
- AVRDC. 1988. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 38–39
- AVRDC. 1989. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 46–51
- AVRDC. 1990. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 44–47
- AVRDC. 1993. Progress Report. AVRDC Publication. Shanhua. Tainan. Taipei. p: 101–109
- AVRDC. 2001. Mungbean Insect Pest: Bruchids. [www.avrdc.org.tw](http://www.avrdc.org.tw)
- Brown, T.A. 1990. Gene Cloning. Chapman and Hall. London.
- Chandra, A. and D. Pental. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: an overview. *Current Science*. 84 (3): 381–387.
- Darmasena, C.M.D. 1989. Effect of moisture content of cowpea seeds on the ovipositional preference and egg mortality of cowpea bruchids. *Food Legumes Coarse Grains Newsletter*. 8: 7.
- Dreyer, M and Echo staff. 1984. General Cultivation Technique: Neem use as insecticide. [www.greenseed.com](http://www.greenseed.com).
- Franco, O.L., D.J. Rigden, Francislete R. Melo, and Maria F. Grossi-de-. 2002. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *Eur. J. Biochem*. 269: 397–412.
- Gai, Qi Xiu. 1993. Resistance evaluation of mungbean lines for *Callosobruchus chinensis*. ARC Report 1993. [www.arc-avrdc.org](http://www.arc-avrdc.org).
- Gatehouse, A. M. R., F. M. Dewey, J. Dove, K.A. Fenton, and A. Pusztai. 1984. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of larvae of *Callosobruchus maculatus*: mechanism of toxicity. *J. of Sci. of Food and Agric*. 35: 373–380.
- Goossens, A., W. Dillen, J. de Clerecq, M. van Montagu, and G. Angenon. 1999. The arcelin-5 gene of *Phaseolus vulgaris* directs high seed-specific expression in transgenic *Phaseolus acutifolius* and *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiol*. 120: 1095–1104.
- Gujar, G.T. and T.D. Yadav. 1978. Feeding of *Callosobruchus maculatus* (Fab) and *Callosobruchus chinensis* (Linn) in green gram. *Indian. J. Entomol*. 40: 108–112.
- Hanover, J.W. 1975. Physiology of three resistance to insects. *Ann. Rev. Entomol*. 20: 75–79.
- Huesing, J.E., R.E. Shade, M.J. Chrispeels, and L.L. Murdock. 1991.  $\alpha$ -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin explains the resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiology*. 96: 993–996.
- Ishii, S. 1952. Studies on the host preference on the cowpea weevil (*Callosobruchus chinensis* L.). *Bull. of the Nat. Inst. of Agric. Sci. I(C)*: 185–256.
- Ishimoto, M and K. Kitamura. 1988. Identification of the growth inhibitor on azuki bean weevil in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Japanese J. of Breeding* 38: 367–370.
- Ishimoto, M., T. Sato, M.J. Chrispeels, and K. Kitamura. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha amylase inhibitor of common bean. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79: 309–315.
- Janzen, D.H., H.B. Juster; and I.E. Liener. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Sci*. 192: 795–796.
- Johnson, D. 1982. Genetic background of durable resistance in crops. Series A: Life Science. Vol. 55. Plenum Press. New York and London. Published in cooperation with NATO Scientific division. 454 p.
- Kogan, M. 1982. Plant resistant in post management. Metcalf, R.L. and Luckman (Ed.). *In* Introduction to Insect Pest Management. 2<sup>nd</sup> Ed. John Willey and Sons.
- Lin, Chan, Ching-San Chen, Shwu-Bin Horng. 2005. Characterization of resistance to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in mungbean variety VC6089A and its resistance-associated protein VrD1. *J. Econ. Entomol*. 2005. 98: 1369–1373.
- Machuka, J. 2000. Potential role of transgenic approaches in the control of cowpea insect pests. p. 213–222 *In* C.A. Fatokun, S. A. Tarawali, B. B. Singh, P. M. Kormawa. And M. Tamü (Eds). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Proc. of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria, 4–8 September 2000.
- Maina, Y.T and N.E.S. Lale. 2004. Integrated management of *Callosobruchus maculatus* (F.) Infesting cowpea seeds in storage using varietal resistance application of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed oil and solar heat. *Int. J. Agri. Biol*. 6(3): 440–446.
- Marwoto. 1987. Ketahanan varietas kacang hijau terhadap serangan hama kumbang bubuk (*Callosobruchus chinensis* L.). *Penelitian Palawija* 2(2): 95–98.

- Morton, R.L., H.E. Schroeder, K.S. Bateman; M.J. Chrispeels, E. Armstrong; T.J.V. Higgins. 2000. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Agric. Sci.* 97(8): 3820–3825.
- Nakahara Kazuhiko, Najeeb S. Alzoreky, Gassinee Trakoontivakorn, and Yupa Hanboonsong. 2005. Prevention of Postharvest Pests Using Aromatic Plants Growing in the Tropics. *JIRCAS NewsLetter*. 43.
- Oka, Ida Nyoman. 2005. Pengendalian Hama Terpadu dan Implementasinya di Indonesia. GMU Press. Yogyakarta. 255 p.
- Painter, R.H. 1951. *Insect Resistance in Crop Plants*. MacMillan. New York. 520 p.
- Painter, R.H. 1958. Resistance of plants to insects. *Annu. Rev. Entomol.* 3: 267–290.
- Piergiovanni, A.R.; C.D. Gatta; B.B Singh; S.R. Singh; N.Q. Ng and P. Perrino. 1990. Biochemical seed analysis in relation Bruchid Resistance in Cowpea Genetic Resources. N.Q. Ng and L.M. Monti (eds). International Institute of Tropical Agriculture. Nigeria. p. 119–127.
- Sarikarin, N.P. Srinives, R. Kaveeta, and P. Saksoong. 1999. Effect of seed texture layer on bruchid infestation in mungbean *Vigna radiata* (L) Wilczek. *Sci. Asia*. 25 (1999): 203–206.
- Schroeder, H.E., S. Gollash, A. Moore, L.M. Tabe, S. Craig, D.C. Hardie, M.J. Chrispeels, D. Spencer, and T.J.V. Higgins. 1995. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L). *Plant Physiol.* 107: 1233–1239.
- Shade, R.E., H.E. Schroeder, J.J. Pueyo, L.M. Tabe, L.L. Murdock, T.J.V. Higgins, and M.J. Chrispeels. 1994. Transgenic peas expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *BioTech.* 12: 793–796.
- Singh D.P. 1986. Breeding for resistance to disease and insect pest. *In Crop Protection Monographs*. p.35–60.
- Slamet, M., S. Sosromarsono, S. Wardoyo, J. Koswara. 1985. Beberapa Aspek Biologi Hama Bubuk (*Callosobruchus chinensis* I) pada kacang hijau. *Penelitian Pertanian*. 5(2): 53–56.
- Suhartina. 2005. Deskripsi Varietas Unggul Kacangkacangan dan Umbi-umbian. Balitkabi. Malang. 154 p.
- Sumarno. 1992. Pemuliaan untuk ketahanan terhadap hama. *Dalam Prosiding Pemuliaan Tanaman I. PERIPI Komisariat Jatim*. 348–363.
- Talekar, N.S. 1988. Mungbean. Shanmugasundaran, S (eds). *In Proc. of the Second Internat. Symp. Asian Vegetable Res. and Dev. Center*. p. 329–342.
- Talekar, N.S and Lin. 1981. Two sources with differing modes of resistance to *Callosobruchus chinensis* in mungbean. *J.Econ Entomol.* 74: 639–642.
- Teetes, G.L. 1996. Plant Resistance to Insect a Fundamental Component. IPM. Dept. of Entomology. Texas A&M University College Station. USA.
- Untung, K. 1993. Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu. UGM Press. p. 273.