Jurnal Kimia Andalas, ISSN 0853-8018
Volume 4, Nomor 2, Tahun 1998 (65-74)

STUDI PENDAHULUAN MANIPULASI GENETIKA PADA KEDELAI (*Glycine max* (L) Merril) VARIETAS SINGGALANG UNTUK TAHAN TERHADAP ALUMINIUM

Armaini, Sumaryati Syukur dan Yefni Widria

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas

INTISARI

Telah dilakukan penelitian manipulasi genetika dari kedelai (*Glycine max* (L) Merriel), varietas Singgalang untuk tahan terhadap aluminium kadar tinggi dengan menggunakan radiasi ultraviolet (a), mutagen kimia natrium azida (b) dan kombinasi radiasi UV dan natrium azida (c).

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap; pertama penentuan konsentrasi $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ sebagai zat selektif diperoleh konsentrasi lethal dari zat selektif seleksi adalah 450 mM, yang dapat membunuh 97,62%. kedelai induk. Tahap kedua; penentuan kondisi optimal; meliputi waktu radiasi dan konsentrasi natrium azida. Diperoleh hasil sebagai berikut; waktu radiasi 2 jam dan konsentrasi natrium azida 2 mM. Tahap selanjutnya adalah manipulasi genetik dari biji kedelai induk.

Frekuensi mutan yang diperoleh berturut-turut adalah $6,9 \times 10^{-3}$; $2,8 \times 10^{-3}$ dan $1,4 \times 10^{-4}$ dari 1440 biji kedelai. Pengamatan dari generasi pertama mutan kedelai (F1) dari perlakuan (a), (b) dan (c) dibandingkan terhadap kontrol diperoleh jumlah polong tanaman dari mutan kedelai berturut-turut 41,137; 103 dan kontrol adalah 86 polong.

Berat dari 100 g biji dari mutan kedelai dibandingkan terhadap kontrol adalah sebagai berikut; 16,3; 13,7; 10,7 g untuk mutan kedelai dan 10,3 untuk kedelai kontrol.

Persentase protein total dari ketiga perlakuan adalah sebagai berikut; 27,44; 40,32; 37,76% untuk mutan kedelai dan 32,70% untuk kedelai kontrol. Hasil yang terbaik untuk menghasilkan mutan kedelai adalah manipulasi dengan natrium azida 2 mM.

ABSTRACT

Genetic manipulation of soybean (*Glycine max* (L) Merril) from Singgalang variety for resistant to high aluminium by ultra violet radiation and chemical mutagent sodium azide have been conducted.

There are 3 steps of experiment, the first step was to determine the selective selection of concentration agent $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$. The lethal concentration of selection agent was 450 mM at which it could kill almost all the wild type (97.62%). The second step was to determination the optimal condition that were duration of UV radiation and concentration of mutagent sodium azide. The result was found for UV radiation time 2 hours and sodium azide concentration at 2 mM. The last step was the treatment of genetic manipulation to the wild type seeds. There are of UV radiation treatment (a), mutagent sodium azide (b) and both treatments (c), and the will be planted in the soil containing the selection agent $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ at 450 mM.

Furthermore, the mutant frequencies were 6.9×10^{-4}, 2.8×10^{-3} and 1.4×10^{-3} respectively, calculated from 1440 speeds. The observation for the first generation (F1) of soybean mutant compered to control plants by using those three treatments (a), (b) and (c), the number of legumes were 41, 137, 103 in the mutant and 86 in the control plants. The weight of 100 seeds was obtained 16.3; 13.7; 10.7 g for the mutant and 10.3 g for the control. The percentages of total protein for those three treatment applied were 27.44, 40.32, 37.76 % for mutant seeds and 32.70% for control seeds. The interesting result were shown that the increment of legumes, seed weight and total protein in the mutant treated by 2 mM sodium azide was performed.

PENDAHULUAN

Tanah masam banyak dijumpai di Indonesia, secara keseluruhan hamparan tanah masam di Indonesia adalah 55 juta Ha, diantaranya 32 juta Ha berjenis podsolik merah kuning (PMK). Tanah jenis ini tidak cocok untuk areal pertanian karena mempunyai beberapa permasalahan yang pokok yaitu : (1) Kekahatan unsur-unsur hara makro dan mikro diantaranya P, Ca, K, N, Mg, Mo, Zn dan Cu, (2) Rendahnya kapasitas tukar kation, kejenuhan basa, kandungan mineral-mineral terlapukan, (3) Keracunan Al, Mn dan juga Fe, (4) Fiksasi P tinggi dan (5) Rentan terhadap erosi.

Pemanfaatan tanah masam sebagai lahan penanaman kedelai telah dilakukan dengan sistim pengapuran, penurunan kejenuhan Al sampai di bawah 20% karena kejenuhan Al merupakan kriteria kemasaman yang baik, terutama ultisol[1]. Kedelai secara umum memiliki toleransi rendah terhadap kemasaman tanah, perbedaan toleransi ditemui pada antar varietasnya[2].

Pada tanah asam (pH < 5), Al tersedia umumnya berlebihan sedangkan P, Ca, dan Mg tersedia kurang. Keadaan ini tidak menguntungkan untuk pertumbuhan kedelai dan sering menyebabkan keracunan, karena Al akan larut dalam jumlah yang cukup banyak. Gejala keracunan Al pada akar tanaman ditandai oleh perubahan warna akar menjadi coklat kekuning-kuningan, turgiditas menurun, pertumbuhan akar primer menebal dan melengkung, tudung akar hancur, serta perkembangan akar cabang memendek dan membesar[3].

Cara lain yang dapat digunakan untuk menjadikan tanah masam sebagai lahan penanaman kedelai adalah dengan merubah genetis dari kedelai agar tahan terhadap kadar Al tinggi pada tanah masam yaitu dengan melakukan manipulasi genetika dengan radiasi lampu UV atau menggunakan mutagen natrium azide atau kombinasi keduanya, dalam hal ini akan diperoleh mutan kedelai tahan terhadap Al.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Bibit kedelai (*Glycine max* (L) Merril) varietas Singgalang dan tanah diperoleh dari BALITAN Sukarami Solok.

Bahan kimia yang digunakan adalah $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$, mutagen natrium azide, pereaksi kimia untuk penentuan protein dengan metoda Kjeddahl.

Alat yang digunakan seperangkat lampu UV Germicidal 40 Watt, labu kjedahl, polybag, pot plastik dan peralatan gelas.

Metoda

Parameter

Parameter yang diamati adalah, frekuensi mutan yang dihasilkan, kandungan protein total, jumlah polong, berat biji kedelai untuk 100 biji, dan juga pengamatan terhadap tinggi tanaman, warna daun, diameter daun, warna bunga, warna biji dan waktu panen.

Inhibisi Pertumbuhan Kedelai Parental

Penentuan konsentrasi selektif dari $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$, terhadap kedelai induk dilakukan dengan cara berikut ; biji kedelai induk (30 biji) dikecambahkan 1 hari kemudian kulit kecambah dibuang dan ditimbang beratnya. Kecambah ditanamkan pada 250 g tanah dalam pot yang ditambahkan 30 ml larutan Al dengan variasi konsentrasi 0 (kontrol), 75, 150, 225, 300, 375 dan 450 mM. Setelah 3 minggu ditanam, biomasa keadaan segar ditimbang. Dari selektif seleksi ini akan diperoleh konsentrasi Al yang dapat menghambat pertumbuhan kedelai 90 - 100%.

Penentuan Kondisi Optimum

Waktu Radiasi UV

Kedelai sebanyak 100 biji direndam dan dibuang kulitnya. Biji tanpa kulit diradiasi UV pada jarak 75 cm dari biji dengan variasi waktu penyinaran 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 jam. Biji dikecambahkan selama 1 hari, kemudian dihitung jumlah yang berkecambah dan ditentukan persentase perkecambahan yang dibandingkan terhadap kontrol. Lama waktu radiasi yang digunakan adalah waktu radiasi yang dapat menghambat perkecambahan sampai 50%.

Konsentrasi Natrium Azide

Kedelai sebanyak 100 biji direndam dalam larutan natrium azide selama 2 jam dengan variasi konsentrasi 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 mM. Kemudian biji dicuci dengan air mengalir selama 20 menit. Biji dikecambahkan selama 1 hari dan dihitung jumlah biji yang berkecambah, kemudian ditentukan persentase perkecambahan yang dibandingkan terhadap kontrol. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi yang dapat menghambat perkecambahan sampai 50%.

Munipulasi Genetika

Radiasi UV (perlakuan A)

Kedelai sebanyak 1.440 biji direndam dan dibuang kulitnya, diradiasi dengan UV selama 2 jam, kemudian dikecambahkan selama 1 hari. Kecambah ditanamkan pada tanah ultisol sebanyak 12 kg yang ditambahkan 1,4 L larutan Al 450 mM pada pot yang besar, diletakkan dalam ruangan yang terkena sinar matahari. Tanaman disiram 2 kali sehari, pertumbuhan diamati selama 3 minggu. Biji kedelai yang tumbuh adalah kedelai yang tahan terhadap kadar Al tinggi, kemudian dipindahkan ke tanah kontrol, ditumbuhkan sampai berbuah dan dipanen (F1).

Mutagen natrium azide (perlakuan B)

Kedelai sebanyak 1.440 biji direndam dalam larutan natrium azide selama 2 jam, dicuci 20 menit dengan air mengalir dan kemudian dikecambahkan selama 1 hari. Kecambah ditanamkan pada tanah ultisol sebanyak 12 kg yang ditambahkan 1,4 L larutan Al 450 mM pada pot yang besar dan diletakkan dalam ruangan yang terkena sinar matahari. Tanaman disiram 2 kali sehari, pertumbuhan diamati selama 3 minggu. Biji kedelai yang tumbuh adalah kedelai yang tahan terhadap kadar Al tinggi, kemudian dipindahkan ketanah kontrol, ditumbuhkan sampai berbuah dan dipanen.

Gabungan radiasi UV dan mutagen natrium azide (perlakuan C)

Kedelai sebanyak 1.440 biji direndam dan dibuang kulitnya. Biji diradiasi UV selama 2 jam, setelah diradiasi direndam dalam larutan natrium azide 2 mM selama 2 jam, dicuci selama 20 menit pada air mengalir dan dikecambahkan selama 1 hari, kemudian ditanam ketanah dengan cara yang sama pada perlakuan (a) dan (b).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inhibisi pertumbuhan kedelai parental

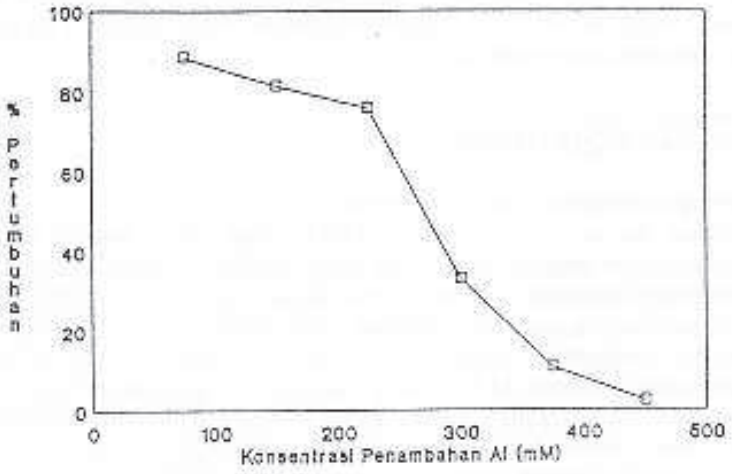
Pemakaian zat penyeleksi $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ pada sistim selektif seleksi terhadap kedelai parental dapat lihat pada Gambar 1. Terjadi penurunan persen pertumbuhan dari kedelai parental dengan meningkatnya konsentrasi zat penyeleksi Al, yang ditambahkan pada tanah. Persen pertumbuhan ditentukan berdasarkan pertambahan berat kecambah. Inhibisi terbesar terjadi pada konsentrasi Al 450 mM yang dapat menghambat pertumbuhan sampai 97,62% (konsentrasi letal). Konsentrasi letal inilah yang digunakan dalam seleksi mutan kedelai tahan Al. Peningkatan inhibisi pertumbuhan oleh Al terhadap kedelai parental ini disebabkan terjadinya keracunan pada tanaman kedelai.

Keracunan ini diduga terjadi karena pada tanah masam (pH < 5) dengan Al tinggi maka garam-garam Al yang terdapat pada tanah akan mudah terion menjadi Al^{3+} yang akan terserap oleh akar tanaman dengan mekanisme pasif yaitu secara difusi, aliran masa. Tingginya kadar Al yang terserap oleh akar mengakibatkan rusaknya membran, tudung akar sehingga warna akar akan menjadi coklat kekuning-kuningan, turgiditas menurun, perkembangan akar cabang memendek dan menebal[2]. Diduga dengan tingginya kadar Al akan mempengaruhi bentuk fosfor dalam tanah yang tadinya dalam bentuk $H_2PO_4^-$ membentuk $Al(OH)_2$ H_2PO_4 yang mengakibatkan terganggunya proses penyusunan DNA dan ikatan pirofosfat dari ATP yang merupakan sumber energi bagi semua kegiatan metabolisme sel, yang dapat menghambat pertumbuhan kedelai.

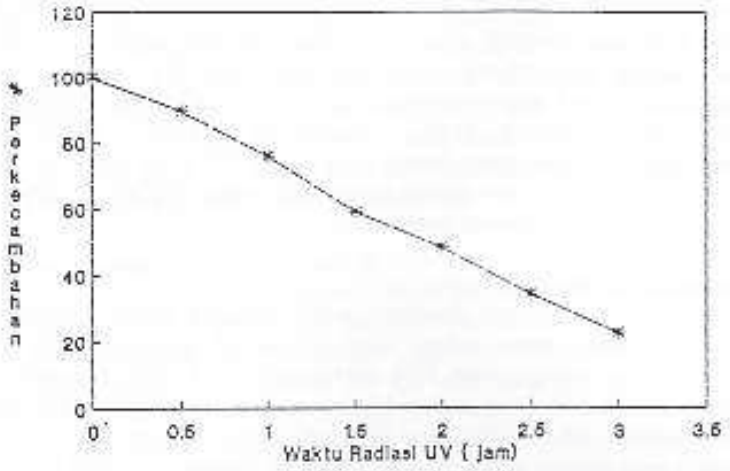
Penentuan kondisi optimum

Lama radiasi UV dan konsentrasi mutagen natrium azide yang optimum adalah waktu radiasi dan konsentrasi mutagen yang dapat mereduksi atau menghambat 50% perkecambahan kedelai parental. Pada kondisi ini diperoleh lama radiasi UV yang optimum adalah 2 jam dengan perkecambahan 48,46% (Gambar 2). Konsentrasi natrium azide optimum adalah 2 mM dengan perkecambahan 51,53% (Gambar 3). Dari Gambar 1 dan Gambar 2 terlihat bahwa makin lama waktu radiasi atau makin tinggi konsentrasi mutagen, makin sedikit jumlah kedelai yang dapat berkecambah. Hal ini disebabkan oleh makin besarnya terjadi kerusakan genetis dari biji

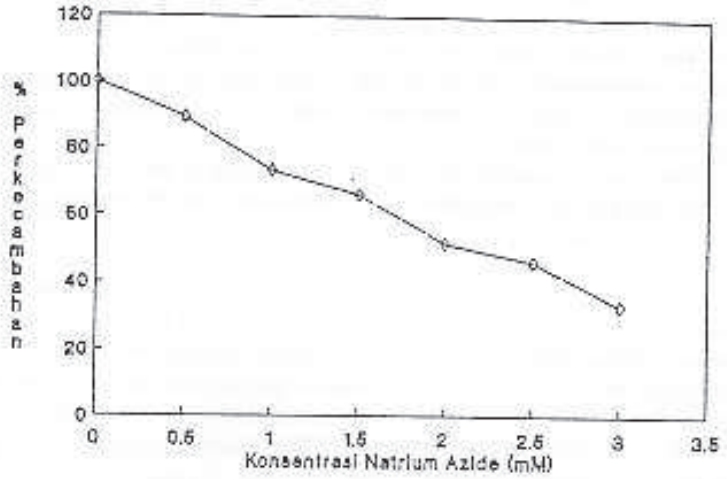
kedelai tersebut, sehingga proses perkecambahan terhambat atau berhenti sama sekali.



Gambar 1. Hubungan inhibisi pertumbuhan kedelai parental dengan konsentrasi zat penyeleksi $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$.



Gambar 2. Pengaruh lama radiasi UV terhadap perkecambahan kedelai parental



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi mutagen natrium azide terhadap perkecambahan kedelai parental.

Manipulasi genetika

Dari ketiga perlakuan manipulasi genetika yaitu dengan radiasi UV (a), mutagen natrium azide (b) dan kombinasi UV dan natrium azide (c) terhadap kedelai telah efektif untuk memperoleh mutan yang tahan terhadap Al tinggi dengan konsentrasi penambahan Al 450 mM (Tabel 1). Frekuensi mutan paling tinggi diperoleh dari perlakuan dengan mutagen natrium azide 2 mM yaitu 2,8 x 10^{-3}, pada perlakuan ini diperoleh lebih banyak jumlah tanaman yang mengalami mutasi.

Tabel 1. Frekuensi muatan pada perlakuan radiasi UV (a), mutagen natrium azide (b) dan kombinasi keduanya (c)

Perlakuan	Jml. Biji ditanam	Jumlah mutan	Frekuensi
1. Radiasi UV 2 jam	1.440	1	6,9 x 10^{-4}
2. Mutagen NaN_3 2mM	1.440	4	2,8 x 10^{-3}
3. Radiasi UV 2 jam + mutagen NaN_3 2 mM	1.440	2	1,4 x 10^{-3}

Pengamatan terhadap jumlah polong tanaman kedelai pertanaman yang dihasilkan pada mutan dibandingkan dengan kontrol diperoleh hasil berturut-turut 41, 137, 103 dan kontrol 86 polong (Tabel 2). Terjadi peningkatan jumlah polong pertanaman pada perlakuan (b) dan (c), sedangkan pada perlakuan (a) terjadi penurunan yang dibandingkan terhadap kontrol (Tabel 2), hal ini disebabkan oleh terjadi perbedaan kecepatan pertumbuhan pada kedelai.

Biji yang diperoleh dari turunan pertama (F1) mutan relatif lebih besar dari pada kontrol ini terlihat dari berat dari 100 biji mutan kedelai berturut-turut 16,3; 13,7; 10,7 g dan kontrol 10,3 g per 100 biji kedelai (Tabel 2). Seperti halnya percobaan yang telah dilakukan terhadap varietas orba yang diperlakukan dengan radiasi gamma memperlihatkan kecendrungan yang sama yaitu jumlah polong dan hasil biji lebih besar dan pemberian tingkat dosis gamma yang berbeda menghasilkan tipe mutan kedelai yang berlainan[3]. Demikian juga terjadinya perbedaan jumlah polong dan peningkatan berat biji ini diduga karena terjadi mutasi yang berbeda atau dihasilkan tipe mutan yang berbeda akibat ketiga perlakuan, sehingga menimbulkan keragaman genetik.

Tabel 2. Jumlah polong pertanaman, berat per 100 biji kedelai, kadar total protein dari turunan pertama (F1) mutan dan kontrol.

Perlakuan	Jml. Polong pertanaman	Berat per 100 biji (g)	Kadar total protein (%)
1. Kontrol	86	10,3	32,70
2. Radiasi UV 2 jam	41	16,3	27,44
3. Mutagen NaN_3 2mM	137	13,7	40,32
4. Radiasi UV 2 jam + mutagen NaN_3 2 mM	103	10,7	37,76

Kadar protein total mutan pada perlakuan dengan natrium azide dan kombinasi (UV dan natrium azide) memperlihatkan peningkatan yaitu 40,32 dan 37,76%, sedangkan pada perlakuan dengan radiasi UV memperlihatkan penurunan yaitu 27,44% jika dibandingkan terhadap kontrol 32,70 %.

Perlakuan yang berbeda akan menghasilkan tipe mutan yang berbeda pula, seperti halnya yang terjadi pada percobaan ini mutasi yang disebabkan oleh radiasi UV akan menghasilkan mutan yang berbeda dengan mutasi yang disebabkan oleh natrium azide, demikian juga untuk kombinasi keduanya.

Radiasi UV merupakan mutasi yang diinduksi, perubahan ini diduga karena terjadinya pembentukan timin dimer[5]. Perubahan urutan DNA akan merubah kode genetik pembentukan asam amino akan merubah protein yang dibentuk. Penurunan kadar protein total ini diduga terjadi akibat penurunan

jumlah asam amino (rantai protein yang terbentuk lebih pendek) karena perubahan kode genetik yang dibentuk, sehingga peningkatan kadar protein total pada perlakuan natrium azide dan kombinasi keduanya disebabkan terbentuknya mutan dengan urutan basa DNA yang berbeda akan merubah kode genetik pembentukan asam amino, hal ini diduga karena terjadinya perpanjangan rantai protein yang disebabkan oleh pembentukan asam amino baru sehingga protein total meningkat. Terjadi peningkatan kadar protein sampai 157,1 % terhadap kontrol akibat mutasi dengan menggunakan mutagen EMS 8 mM (15 jam dan 28 ^{o}C) pada jenis padi-padian[6].

KESIMPULAN

Manipulasi genetika yang dilakukan pada kedelai (*Glycine max* (L) Merril) varietas Singgalang, dengan menggunakan $Al_2(SO_4)_3.18H_2O$ 450 mM sebagai zat penyeleksi dengan letal konsentrasi 97,62%. Perlakuan dengan menggunakan lampu UV dengan lama penyinaran 2 jam dan natrium azide 2 mM sebagai mutagen atau kombinasi keduanya, efektif untuk menciptakan mutan-mutan kedelai yang tahan terhadap kadar logam Al tinggi.

Dari pengamatan terhadap mutan dari segi frekuensi yang didapatkan, kadar protein total, jumlah polong dan fisik tanaman disimpulkan bahwa perlakuan dengan natrium azida menghasilkan mutan yang tahan terhadap Al tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Widjaya-Adi. I. P. G., Pengapuran tanah masam untuk kedelai, dalam S. Somaatmadja *et. al.* (eds). *Kedelai. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.* Bogor. 1985. Hal. 176.
2. Delvin, T. E., Aluminium and magnese toxicities in legumes. in Wright, H. and S. A Ferrari., eds. *Plant adaptation to mineral stress in problem soils* 1976. p. 72.
3. Kholi, J. R., Aluminium toxicity in some highly weathered soil of the tropics. *Soil Sci. Plant Nutr.* 9(1), 30-51, 1974.
4. Rivai Ratna, Pengaruh iradiasi gamma terhadap timbulnya mutasi imbas. *Majalah BATAN*, XX(2), 7-15, 1987.
5. Russo, R. N. and J. E. Russo, Demonstration of DNA strand breakage induced by ultraviolet light. *J. Chem. Educ.* 70 (4), 330-332, 1993.
6. Odeagah, P. G. C., Invitro mutation breeding for seed protein, alpha amylase activity and herbicide resistance in bulrush millet (*Pennisitium nigritarum*). IAEA-SM 311/148, 1990.

7. Ragland, J. L. and N. T. Coleman, The effect of soil aluminium and calsium on root growt. *Soil Sci. Society Proceeding*, 355-357, 1959..
8. Rasmussen R. J., Influence of aluminium ion on developmental morphology of soybean roots. *J. Agr.* 74 : 687-690, 1976.
9. Crowley, C., P. Jones and O. Byrne. Use of grain charactersas indirect selection criteria in the mutation breeding of cereals IAEA-SM 311/111, 65-71, 1991..
10. Derera, N. F. and G. M. Bhatt., Effectiveness of mecanical mass selection in wheat (*Triticum destivum* L). *Aust. J. Agric. Res.* 23 : 761, 1972.
11. Marshall, d. R., F. W. Ellison and D. J. Mares, Effect of grain shape and size on milling yeilds in wheat. *Aust. J. Agric. Bot.* 13 : 152, 1974..