

KEMAJUAN PERAKITAN GALUR KEDELAI UNGGUL MELALUI REKAYASA GENETIK DI INDONESIA

Saptowo J. Pardal

*Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber
Daya Genetik Pertanian”*

Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

PENDAHULUAN

Kedelai adalah komoditas tanaman pangan utama kedua setelah padi di Indonesia. Kebutuhan kedelai terus meningkat setiap tahun, sedangkan produksi kedelai nasional masih sangat rendah sehingga tidak dapat mencukupi kebutuhan konsumsi (Tasma *et al.* 2015). Kebutuhan industri pangan dalam negeri terhadap kedelai rata-rata 2,3 juta ton biji kering/tahun, sedangkan konsumsi kedelai mengalami peningkatan dari 2,35 juta ton pada tahun 2009 menjadi 2,71 juta ton pada tahun 2015, dan diproyeksikan 3,35 juta ton pada tahun 2025, sehingga ada peningkatan rata-rata sebesar 19% per tahun pada periode 2009-2025 (Aldillah 2014). Produksi dalam negeri rata-rata lima tahun terakhir sebesar 982,47 ribu ton biji kering atau hanya 43% dari kebutuhan.

Beberapa masalah yang dihadapi dalam upaya peningkatan produksi kedelai adalah masih rendahnya produktivitas varietas kedelai di Indonesia, serangan hama dan penyakit, cekaman biotik dan abiotik serta semakin berkurangnya lahan untuk pe-

nanaman kedelai akibat alih fungsi lahan pertanian, khususnya di pulau Jawa (Anggraito 2012). Upaya perakitan varietas kedelai unggul telah dilakukan melalui pemuliaan konvensional dengan menyilangkan galur ataupun varietas kedelai yang ada, namun hingga saat ini belum diperoleh varietas kedelai yang benar-benar unggul dengan produktivitas tinggi.

Salah satu hama penting kedelai yang hingga saat ini belum bisa diatasi adalah penggerek polong (*Etiella zinckenella*). Pengendalian hama ini secara kimiawi dengan insektisida kurang efektif mengingat tipe serangan hama yang menyerang di dalam polong. Selain itu, pengendalian kimiawi tidak ramah lingkungan akibat residu pestisida yang ditimbulkannya. Kerusakan akibat serangan hama ini bisa mencapai 80% bahkan bisa puso apabila tidak dikendalikan. Penggunaan varietas kedelai tahan hama penggerek polong merupakan alternatif pengendalian hama yang lebih murah, efektif, dan ramah lingkungan.

Laju alih fungsi lahan pertanian yang tinggi di Pulau Jawa, sebagai daerah penghasil produk pertanian utama di Indonesia, menjadi salah satu ancaman bagi keberlanjutan penyediaan bahan pangan. Pada sisi lain, Indonesia sebenarnya masih memiliki banyak lahan marjinal (suboptimal) yang potensial untuk dijadikan lahan pertanian (Pardal & Suharsono 2016). Namun tanah ini umumnya masam, kejenuhan basa rendah, dan berpotensi keracunan Al bagi tanaman serta kandungan bahan organik rendah, kahat hara tertentu seperti P, Ca, Mg, N dan K, sehingga kendala bagi pengembangan lahan masam (Mulyani *et al.* 2009).

Perakitan varietas kedelai toleran cekaman biotik dan abiotik dapat dilakukan melalui proses penapisan, seleksi dan persilangan. Pada tahun 2012 telah dilepas varietas kedelai unggul tahan penggerek polong Dering 1 hasil silang tunggal varietas unggul Davros × MLG 2984 dengan hasil rata-rata 2,0 ton/ha. Varietas ini juga toleran kekeringan cocok untuk lahan sawah dan tegalan.

Demas 1 adalah varietas unggul kedelai adaptif lahan kering masam yang dilepas tahun 2014 dengan Keputusan Menteri Pertanian RI No. 1176/Kpts/SR.120/11/2014. Demas 1 berasal dari persilangan antara Mansuria × SJ-5 dengan galur SC5P2P3.5.4.1-5. Varietas ini memiliki keunggulan dibandingkan dengan varietas Tanggamus (varietas unggul adaptif lahan kering masam) dan varietas Wilis (memiliki daya adaptasi luas). Keunggulan Demas 1 adalah hasil biji rata-rata tinggi yaitu 1,70 t/ha, lebih tinggi daripada Wilis (1,41 t/ha) dan Tanggamus (1,45 t/ha). Potensi hasil mencapai 2,51 t/ha pada kondisi cekaman kemasaman tanah, lebih tinggi daripada Tanggamus (1,95 t/ha). Ukuran biji 12,88 g/100 biji lebih besar dibandingkan dengan varietas Wilis dan Tanggamus. Varietas ini tahan terhadap penggerek polong *Etiella zinckenella*, tahan terhadap penyakit karat daun *Phakopsora pachyrhizi*, agak tahan terhadap pengisap polong *Riptortus linearis*, serta memiliki kandungan protein biji mencapai 36,07%, lebih tinggi daripada Wilis (34,93%) dan Tanggamus (35,98%) (Jamil *et al.* 2016).

Alternatif teknologi yang dapat digunakan untuk merakit varietas kedelai tahan hama dan toleran lahan masam adalah melalui bioteknologi atau rekayasa genetik, yaitu dengan cara menyisipkan gen ketahanan hama dan gen toleran masam ke dalam tanaman kedelai budi daya melalui *Agrobacterium* ataupun penembakan partikel (Anggraito 2012). Dalam tulisan ini dibahas kemajuan dan hasil-hasil perakitan varietas kedelai unggul melalui rekayasa genetik.

PENYEBARAN VARIETAS UNGGUL PRODUKREKAYASA GENETIK SECARA GLOBAL

Kerawanan pangan global adalah masalah besar di negara-negara berkembang, dengan sekitar 108 juta orang di negara-negara yang terkena krisis pangan masih berisiko atau mengalami kerawanan pangan. Selama lebih dari 20 tahun pengamatan, menunjukkan bahwa adopsi tanaman bioteknologi di negara-negara berkembang telah berkontribusi terhadap hasil yang lebih tinggi, produksi yang lebih aman, dan peningkatan pendapatan sangat berkontribusi pada penurunan kemiskinan, kelaparan dan kekurangan gizi di beberapa wilayah di dunia yang paling rentan terhadap tantangan ini.

Laporan ISAAA (*the International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*) menunjukkan bahwa area tanaman biotek secara global meningkat pada tahun 2017 sebesar 3 persen atau 4,7 juta hektar. Peningkatan ini terutama disebabkan oleh profitabilitas yang lebih besar yang berasal dari harga komoditas yang lebih tinggi, peningkatan permintaan pasar baik domestik maupun internasional, dan keberadaan teknologi benih yang tersedia. Karena semakin banyak negara berkembang, kini 19 total termasuk India, Pakistan, Brasil, Bolivia, Sudan, Meksiko, Kolombia, Vietnam, Honduras, dan Bangladesh telah meningkatkan area tanaman biotek mereka dan terus memungkinkan para petani untuk mengadopsi bioteknologi dalam produksi pangan, petani kecil lihat peningkatan langsung yang ditawarkan ini, yang memungkinkan mereka untuk menyediakan kehidupan yang lebih baik bagi diri mereka sendiri dan keluarga mereka. Bahkan, negara-negara berkembang kini mencapai 53 persen dari luas area biotek global yang ditanam.

Area global tanaman biotek (transgenik) terus meningkat pada tahun 2017, mencapai 189,8 juta hektar dibandingkan dengan 185,1 juta hektar pada tahun 2016.

Pada tahun 2017, sebanyak 67 negara menggunakan tanaman biotek dan 19 di antaranya adalah Negara berkembang. Varietas kedelai transgenik atau kedelai biotek menyumbang 50 persen dari luas tanaman transgenik global pada tahun 2017. Negara-negara dengan lebih dari 90 persen yang mengadopsi kedelai biotek adalah Amerika Serikat, Brasil, Argentina, Paraguay, Afrika Selatan, Bolivia dan Uruguay; mendekati atau lebih dari 90 persen adopsi jagung biotek adalah Amerika Serikat, Brasil, Argentina, Kanada, Afrika Selatan dan Uruguay; mendekati atau lebih dari 90 persen adopsi kapas biotek adalah Amerika Serikat, Argentina, India, Paraguay, Pakistan, Cina, Meksiko, Afrika Selatan dan Australia; dan dengan 90 persen atau lebih dari kanola biotek adalah Amerika Serikat dan Kanada. Sebagian Negara tersebut adalah negara pengekspor makanan yang dibutuhkan oleh seluruh dunia termasuk negara-negara berkembang yang besar, termasuk Indonesia.

Kedelai transgenik yang telah dikomersialkan adalah kedelai tahan herbisida, *Roundup Ready* (James 2017). Kedelai transgenik ini tahan herbisida berbahan aktif glifosat. Kedelai ini dirakit melalui transfer gen EPSPS dari *Agrobacterium* sp. strain CP4 dan dikomersialkan pada tahun 1996. Berdasarkan hasil pengkajian keamanan lingkungan, pangan dan pakan di Amerika Serikat kedelai RR ini telah dinyatakan aman lingkungan, pangan dan pakan karena mengandung nutrisi yang sama dengan kedelai nontransgeniknya. Kedelai ini juga telah dinyatakan aman di Kanada, Jepang, Eropa dan Negara-negara lain. Enzim CP4 EPSPS sudah umum terdapat pada kedelai dan juga tanaman lainnya. Enzim ini sangat sensitif terhadap glifosat. Protein CP4 EPSPS dari *Agrobacterium* berfungsi sama dengan enzim EPSPS, namun toleran terhadap glifosat sehingga tanaman kedelai RR toleran terhadap glifosat (*roundup ready*). Protein CP4 EPSPS telah dievaluasi melalui serangkaian uji dan dinyatakan aman untuk dikonsumsi karena kadarnya sangat rendah pada biji kedelai

(0,1% dari total protein), sangat cepat dicerna, tidak menimbulkan alergi dan tidak menimbulkan bahaya pada hewan ternak sebagai pakan (Monsantoglobal 2000).

Tanaman kedelai dan jagung biotek khususnya, telah membantu negara-negara berkembang memenuhi kebutuhan mereka untuk pakan sebagai sumber protein hewani dan ikan. Namun di Indonesia, kedelai impor juga dikonsumsi sebagai bahan pangan, yaitu untuk tempe, tahu dan lain-lain.

Indonesia termasuk salah satu Negara pengimpor kedelai terbesar, yang sebagian besar berasal dari Amerika yang notabene adalah kedelai transgenik. Kedelai impor tersebut sebagian besar dijadikan bahan baku pembuatan tempe dan selebihnya digunakan untuk pakan ternak. Para pengrajin tempe memilih kedelai impor karena ukuran bijinya lebih besar dan yang paling penting selalu tersedia dipasaran (kontinuitas terjamin). Bahkan pemerintah Amerika membuka kantor perwakilan ekspor kedelai ke Indonesia, yaitu USSEC (United State Soybean Export Council) yang berkedudukan di Singapore.

Kedelai transgenik lain yang telah dihasilkan oleh perusahaan multi nasional Amerika adalah kedelai BT tahan hama. Kedelai ini mengandung gen *cryIAC* yang diisolasi dari bakteri *Bacillus turingiensis*. Kedelai PRG event MON 87701 ini merupakan kedelai produk rekayasa genetik dari perusahaan Monsanto yang dapat memproduksi protein *Cry1Ac* dan diklaim dapat memberikan perlindungan dari kerusakan akibat hama serangga Lepidoptera. Protein *Cry1Ac* yang diproduksi oleh kedelai PRG event MON 87701 mempunyai identitas asam amino 100% sama dengan protein *Cry1Ac* kapas Bollgard, kecuali pada tambahan 4 asam amino di N-terminus. Protein ini sudah terbukti efektif terhadap hama Lepidoptera.

Kedelai ini telah dicoba untuk dikomersialkan di Indonesia dan telah dilakukan pengkajian keamanan lingkungan dan keamanan pangan. Berdasarkan Peraturan Kepala Badan POM

HK.03.1.23.03.12.1563 Tahun 2012 tentang Pedoman Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik dan surat Kepala Badan POM kepada Ketua Komisi Keamanan Hayati Produk Rekayasa Genetik Nomor SD.11.05.1.52.04.11.03590 tanggal 13 April 2011 perihal Pengkajian Keamanan Pangan Produk Rekayasa Genetik (PRG) Komoditas Kedelai PRG *event* MON 87701, TTKH telah melakukan pengkajian keamanan pangan kedelai PRG *event* MON 87701 berdasarkan informasi genetik dan informasi keamanan pangan yang terdiri atas kesepadanan substansial, alergenisitas, dan toksisitas sebagaimana diuraikan di bawah ini. Sebelumnya, kedelai PRG *event* MON 87701 telah memperoleh sertifikat aman pangan di 5 negara yaitu Amerika Serikat (2010), Australia (2010), Kanada (2010), Selandia Baru (2010), Meksiko (2010), dan Jepang (2011). Namun, PRG tersebut batal dikomersialkan di Indonesia karena adanya penolakan dari sekelompok anti PRG (NGOs) di Indonesia dan juga belum mendapatkan status aman pakan. Bahkan baru-baru ini Monsanto, pemilik Bt Soybean menghentikan atau menarik peredarannya di U.S. (Monsanto 2018).

KEMAJUAN PERAKITAN VARIETAS UNGGUL KEDELAI PRODUK REKAYASA GENETIKA DI INDONESIA

Perakitan varietas kedelai unggul produk rekayasa genetika telah lama dilakukan di Indonesia. Karakter targetnya adalah ketahanan terhadap hama penggerek polong dan toleransi terhadap keracunan aluminium. Dua karakter tersebut sangat penting untuk pengembangan kedelai di Indonesia.

PERAKITAN GALUR UNGGUL KEDELAI TAHAN PENGGEREK POLONG

Penggerek polong (*Etiella zinckenella*, Trietchke) merupakan hama penting kedelai yang hingga saat ini masih sulit dikendalikan. Pengendalian secara kimiawi menggunakan pestisida kurang efektif dan tidak ramah lingkungan akibat residu yang ditimbulkan. Perakitan kedelai tahan hama ini melalui persilangan biasa menghadapi kendala tidak adanya sumber gen ketahanan pada varietas kedelai yang ada.

Perakitan kedelai tahan melalui rekayasa genetik merupakan salah satu alternatif solusi untuk mengatasi kendala tidak adanya gen ketahanan. Melalui teknik ini, dimungkinkan menghasilkan galur atau varietas kedelai tahan penggerek polong dengan cara menyisipkan gen (transfer gen) ketahanan ke dalam genom kedelai. Transfer gen ketahanan terhadap penggerek polong kedelai dapat dilakukan melalui dua metode, yaitu secara langsung dengan bantuan mesin penembak gen (*particle bombardment*) atau secara tidak langsung dengan bantuan *Agrobacterium*.

Salah satu gen yang dapat digunakan untuk perakitan kedelai tahan penggerek polong adalah gen *proteinase inhibitor (pin) II*. Gen *proteinase inhibitor (pin) II* merupakan gen pengkode senyawa anti nutrisi yang dapat menghambat kerja enzim proteolitik (*proteinase*) di dalam perut serangga. Contoh keberhasilan penggunaan gen *pin* untuk transformasi genetik tanaman antara lain pada padi, ubi jalar dan tembakau (Pardal *et al.* 2005).

TRANSFORMASI KEDELAI MELALUI *AGROBACTERIUM*

Agrobacterium tumefaciens adalah bakteri tanah yang biasa digunakan sebagai *vector* alami dalam transfer gen, karena bakteri ini memiliki T-DNA (transfer DNA) yang dapat digunakan untuk menyisipkan gen *insert* ke dalam genom tanaman.

Transformasi kedelai dengan gen *pin II* ke dalam eksplan kotiledon muda kedelai telah berhasil dilakukan menggunakan *vector Agrobacterium* rekombinan *pGApinII*. Sejumlah embrio somatik kedelai dari varietas Wilis dan Tidar telah berhasil diperoleh, namun tidak semua embrio somatik berhasil diregenerasikan menjadi tanaman T0. Dari 1539 eksplan Wilis dapat dihasilkan 8 tanaman T0 dan diberi kode AW1-AW8). Sedangkan dari 984 eksplan Tidar hanya dihasilkan 1 tanaman T0 dan diberi kode AT1 (Gambar 3.8). Tanaman T0 kedelai tersebut menunjukkan positif gen *pin II* pada hasil analisis PCR. Selanjutnya analisis molekuler pada generasi berikutnya, yaitu T1, T2, T3 dan T4, hanya satu galur dari Tidar (AT1) yang masih membawa gen *pinII*. Hasil uji *bioassay* tanaman kedelai transgenik menggunakan larva instar 1 hama penggerek polong (*Etiella zinckenella*, Trietchke) di Fasilitas Uji Terbatas (FUT) menunjukkan adanya ketahanan terhadap hama ini. Hal ini ditunjukkan dengan adanya angka kematian (mortalitas) larva *Etiella zinckenella* yang lebih tinggi dibanding polong muda kedelai nontransgenik yang diinokulasi (Pardal *et al.* 2004).



Gambar 3.8. Tanaman kedelai AT1 hasil transformasi *Agrobacterium* positif *pinII*

TRANSFORMASI KEDELAI MELALUI PENEMBAKAN PARTIKEL (*PARTICLE BOMBARDMENT*)

Penembakan partikel (*Particle bombardment*) merupakan salah satu metode transfer gen secara langsung (non alami). Penembakan partikel memungkinkan introduksi/transfer gen atau DNA asing ke dalam sel atau jaringan target secara langsung tanpa harus menumbuhkan sel target terlebih dahulu, sehingga evaluasi ekspresi transien konstruksi gen dapat langsung dilakukan pada sel/jaringan target setelah penembakan.

Transformasi kedelai menggunakan metode penembakan partikel telah berhasil dilakukan pada eksplan koteiledon muda kedelai var. Tidar dan Wilis umur 14-15 hari. Dari 134 eksplan Wilis yang ditembak, hanya mampu menghasilkan 1 tanaman T0 (WP2), sedangkan dari 456 eksplan Tidar dapat diperoleh 3 tanaman T0 (TP1, TP2, TP3). Hasil analisis molekuler tanaman T0 dengan teknik PCR menunjukkan adanya gen *pinII* (Gambar 3.9). Kemudian uji lanjut pada generasi T1, T2 dan T4 hanya galur Wilis WP2 yang masih menunjukkan adanya gen *pinII*. Hal ini menunjukkan bahwa galur kedelai WP2 masih stabil membawa gen *insert pinII*. Hasil bioassay terhadap tanaman polong muda kedelai transgenk dengan larva instar 1 *Etiella zinckenella* menun-



Gambar 3.9. Tanaman kedelai T0 hasil particle bombardment positif *pinII*

jukkan adanya ketahanan terhadap hama tersebut. Hal ini ditunjukkan tingginya angka mortalitas larva hama pada polong kedelai transgenik dibandingkan polong kedelai non transgenik yang diinokulasi.

PERAKITAN GALUR KEDELAI TOLERAN LAHAN MASAM

Aluminium merupakan unsur nomor tiga dalam hal kelimpahannya di bumi setelah oksigen dan silikon. Aluminium yang dilepaskan ke larutan tanah akan berpengaruh buruk pada taraf tertentu bagi tanaman dan merupakan faktor pembatas pertumbuhan pada berbagai tanah masam di dunia (Pilon-Smits *et al.* 2009). Pengapuran yang selama ini dilakukan dirasa kurang ekonomis dan kapur mudah hilang pengaruhnya. Untuk itu diperlukan varietas tanaman kedelai toleran keracunan aluminium (Al) yang dapat beradaptasi pada lahan masam dengan kelarutan logam tinggi, sehingga dapat ditanam di lahan-lahan masam Indonesia, khususnya di luar Jawa (Anggraito 2012).

Perakitan varietas kedelai toleran keracunan Al dapat dilakukan melalui proses penapisan, seleksi dan persilangan. Namun hingga saat ini belum diperoleh varietas kedelai yang betul-betul toleran atau dapat beradaptasi dan berproduksi tinggi di lahan masam. Alternatif teknologi yang kini dapat digunakan untuk merakit varietas kedelai toleran lahan masam adalah melalui bioteknologi atau rekayasa genetik, yaitu dengan cara menyisipkan gen toleran masam ke dalam tanaman kedelai budi daya (Suharsono & Yusuf 2006).

Melastoma (Harendong) merupakan salah satu spesies tanaman yang mampu tumbuh pada tanah dengan pH rendah dan kelarutan Al tinggi, sehingga potensial digunakan sebagai sumber gen toleran terhadap cekaman pH rendah dan Al tinggi (Muhaemin 2009). Tanaman ini memiliki kemampuan tinggi untuk menyerap dan mengakumulasi Al pada daun, terutama

pada sel-sel epidermis atas dan mesofil, serta pada seluruh jaringan akar, sehingga tanaman ini disebut akumulator Al (Watanabe *et al.* 2008). Mutiasari (2008), menunjukkan bahwa *Melastoma affine* D. Don. atau *Melastoma malabathricum* pada media cair dengan pH 4,0 dan 3,2 mM Al, mampu mengakumulasi 8,81 g Al/kg dalam daun tua selama dua bulan.

Salah satu gen toleransi terhadap pH rendah dan Al tinggi adalah *MaMt2*. Gen penghasil senyawa metalothionein ini telah berhasil diisolasi dari tanaman *Harendong* (*Melastoma malabathricum*). Gen ini yang diperoleh dari hasil transkripsi balik mRNA dari *M. malabathricum* yang telah diisolasi, dikarakterisasi dan diklon ke dalam plasmid pGEMT-easy (Suharsono *et al.* 2009), kemudian disisipkan ke dalam vektor ekspresi pIG6 di dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Konstruksi ekspresi berlebih untuk gen *MaMt2* dilakukan dengan menggabungkannya pada promotor kuat Ubiquitin dari jagung dan ditambahkan terminator NOS di bagian hilir, sehingga pola ekspresi gen akan berubah dari gen *inducible*, menjadi konstitutif (ekspresi terus menerus/berlebih). Konstruksi ini menguntungkan tanaman, karena akan dapat memproduksi protein target yang tidak bergantung pada senyawa-senyawa penginduksi atau kondisi lingkungan yang ada (Hannum 2012).

Bakteri *Agrobacterium* yang membawa gen *MaMt2* dan promotor ubiquitin serta terminator NOS pada T-DNA tersebut diinokulasikan pada eksplan kotiledon tua kedelai var. Lumut. Dari transformasi ini berhasil diperoleh 31 tanaman kedelai hasil regenerasi (T0). Hasil analisis PCR terhadap tanaman T0 tersebut diperoleh 9 tanaman positif mengandung gen *MaMt2*. Masing-masing lima benih dari kesembilan tanaman kedelai transgenik *MaMt2* selanjutnya ditanam di rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas (FUT). Kemudian tanaman T1 dari masing-masing *event* (galur) disamping untuk analisis PCR. Hasil analisis PCR diperoleh 4 galur kedelai T1 positif mengandung gen *MaMt2*, yaitu galur

GM2, GM5, GM10 dan GM14 (Anggraito 2012). Selanjutnya empat galur tanaman T1 ini *diselfing* dan menghasilkan benih T2 (Pardal *et al.* 2014). Benih kedelai T2 dari empat galur ini selanjutnya dievaluasi lebih lanjut pada penelitian ini.

Ujiantang diperlukan untuk mengetahui pengaruh integrasi gen *MaMt2* terhadap morfologi tanaman dan toleransinya terhadap cekaman Al pada tanah masam (pH rendah). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toleransi galur kedelai T2 yang berasal dari galur GM2, GM5, GM10 dan GM14 terhadap Al baik secara genetik (molekuler) dan fenotipik. Melalui penelitian ini dapat diperoleh galur kedelai transgenik T2 yang membawa gen *MaMt2* dan toleran terhadap cekaman Al pada tanah masam.

Penelitian dilakukan di rumah kaca, Fasilitas Uji Terbatas (FUT), dan di laboratorium Biologi Molekuler, BB Biogen Bogor, pada tahun 2015. Bahan yang digunakan adalah benih empat galur kedelai transgenik T2 yang merupakan hasil penyerbukan sendiri (*selfing*) tanaman kedelai transgenik T1 yang positif membawa gen *MaMt2*, yaitu GM2, GM5, GM10 dan GM14. Tiga varietas kedelai Lumut, Sindoro dan Tanggamus digunakan sebagai tanaman kontrol. Varietas Lumut merupakan kontrol peka terhadap Al (kontrol negatif) dan merupakan tetua dari keempat galur kedelai transgenik tersebut. Sedangkan varietas Sindoro dan Tanggamus merupakan tanaman kontrol toleran Al (kontrol positif). Penelitian terdiri atas tiga tahapan, yaitu: (1) Uji higromisin; (2) Uji toleransi galur kedelai T2 terhadap Al; dan (3) Deteksi gen *MaMt2*.

Hasil pengamatan pada empat hari setelah penanaman menunjukkan bahwa benih dari keempat galur kedelai transgenik yang diuji dapat berkecambah 100% baik pada media higromisin maupun akuades (kontrol), namun terdapat perbedaan pada panjang akar dan warna kecambah. Akar kecambah pada media higromisin rata-rata lebih pendek dibandingkan kecambah pada media air (1:3) dan lebih pucat warna kecambahnya. Hal ini di-

sebabkan kecambah kedelai transgenik mengandung gen ketahanan antibiotik higromisin, *hptII*, sehingga dapat berkecambah pada media higromisin 25 mg/l. Namun, ukuran akar kecambah yang lebih pendek dan warna agak pucat dibandingkan dengan kecambah kontrol menunjukkan adanya seleksi dari higromisin. Sebaliknya, benih kedelai kontrol toleran dan peka Al tidak dapat berkecambah di media higromisin, tetapi dapat berkecambah 100% di media air. Hal ini disebabkan tidak adanya gen ketahanan higromisin pada benih kedelai non transgenik tersebut.

Hasil analisis terhadap empat jenis tanah perlakuan uji Al (media A, B, C, dan D) sebelum ditanami, di Balittanah-Bogor menunjukkan bahwa media A memiliki pH 4,8 dengan kandungan Al^{3+} terlarut 5,02 cmol/kg, C 0,28%, dan N 0,03%. Media B memiliki pH 5,0 dengan kandungan Al^{3+} terlarut 0,62 cmol/kg, C 3,18% dan N 0,37%. Media C memiliki pH 8,1, Al^{3+} terlarut 0,0 cmol/kg, C 2,64%, dan N 0,25%. Sedangkan media D (kontrol) memiliki pH 7,0, Al^{3+} terlarut 0,0 cmol/kg, C 1,89% dan N 0,24%.

Hasil pengamatan pada media A yang berisi tanah masam Jasinga dengan pH 4,8 dan kandungan Al^{3+} terlarut 5,02 cmol/kg, menunjukkan bahwa tanaman dari keempat galur kedelai transgenik T2 dapat tumbuh pada media tersebut. Data rata-rata tinggi tanaman pada empat minggu setelah tanam, galur GM 10, GM 2, dan varietas Sindoro menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan yang lainnya. Pertumbuhan terbaik ditunjukkan oleh galur GM 10 dengan rata-rata tinggi tanaman 74,3 cm, kemudian Sindoro 73,8 cm dan GM 2 48,2 cm. Adanya gen *MaMt2* pada galur kedelai T2 tersebut, menyebabkan tanaman dapat mengekskresikan senyawa *metalothionein* dan mengakumulasi ion Al yang terlarut di tanah, sehingga tanaman dapat tumbuh baik meskipun lahan ber-pH rendah dan kelarutan Al tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Muhaemin (2009), dimana tanaman yang memiliki gen *MaMt2* memiliki kemampuan yang tinggi dalam menyerap dan mengakumulasi Al di daun,

terutama pada sel-sel epidermis atas dan mesofil, serta pada seluruh jaringan akar (Pardal & Suharsono 2016).

Eksresi gen *MaMt2* tanaman diregulasi oleh berbagai faktor, diantaranya oleh cekaman logam berat (Usha *et al.* 2007; Huang & Wang 2010). Hal ini menunjukkan bahwa protein *metallothionein* kemungkinan diekspresikan pada akar sebagai tanggap terhadap cekaman Al. Hal senada juga ditunjukkan oleh Trisnaningrum (2009), bahwa cekaman Al terhadap *Melastoma affine* pada konsentrasi 3,2 mM menyebabkan kenaikan ekspresi gen *MaMt2* pada akar, tetapi tidak pada daun. Varietas Sindoro yang merupakan varietas toleran Al juga dapat tumbuh baik pada media tanah masam. Fungsi *metallothionein* produk protein dari gen *MaMt2* dihubungkan dengan kemampuannya untuk mendetoksifikasi logam berat atau fungsi homeostasis logam bivalen. Hal ini terkait dengan kandungan asam amino sistein yang tinggi. Gugus sulfhidril (S-H) dari residu sistein akan mengkelat logam, sehingga tidak reaktif bagi sel atau jaringan (Ryan *et al.* 2009). Meski sampai saat ini belum ada laporan tentang pengkelatan logam Al oleh *metallothionein*, tetapi dengan melihat kemampuan gugus sulfhidril mengikat logam-logam bivalen (Cu, Zn, Mn, Cd, dsb.), maka ada kemungkinan bahwa protein *Metallothionein* (MT) juga mampu mengkelat Al meskipun dalam jumlah molekul yang lebih rendah. Untuk itu perlu dilanjutkan uji tantang dengan berbagai konsentrasi Al untuk mengetahui bagaimana protein MT ini bekerja dalam mengkelat logam Al.

Pada media B yang berisi tanah masam ditambah dengan kompos, hasilnya menunjukkan bahwa galur-galur kedelai transgenik tidak tumbuh dengan baik pada media ini. Hal ini dapat dilihat dari data rata-rata tinggi tanaman. Kompos yang ditambahkan ternyata belum bisa menaikkan pH tanah (hasil analisis tanah B menunjukkan pH 5 dan kandungan Al^{3+} terlarut 0,62 cmol/kg), sehingga tanah masih bersifat masam dan mengandung Al. Kondisi ini tidak sesuai untuk pertumbuhan tanaman

kedelai. Selain itu, pada media ini tanaman kedelai terserang penyakit, sehingga pertumbuhannya tidak optimal. Galur yang tumbuh lebih baik adalah Sindoro dan GM 5. Rata-rata tinggi tanaman tertinggi adalah Sindoro (29,8 cm), kemudian GM 5 (21,6 cm) dan GM 10 (20,1 cm)..

Pada media C, galur-galur kedelai transgenik juga tidak tumbuh dengan baik berdasarkan data rata-rata tinggi tanaman selama empat minggu, kecuali galur GM 2, varietas Lumut, dan Sindoro. Pada media ini, tanah masam ditambah dengan kompos dan kapur. Kapur yang ditambahkan dapat menaikkan pH tanah (hasil analisis tanah C menunjukkan pH 8,1 dan kandungan Al^{3+} terlarut 0,0 cmol/kg), namun kapur mudah mengalami *leaching* (pencucian) oleh air pada saat penyiraman sehingga hilang pengaruhnya (Anggraito 2012).

Pada media D yang berisi tanah biasa (non masam) ditambah kompos dan NPK menunjukkan pH 7 (normal) dan kandungan Al^{3+} terlarut 0,0 cmol/kg, sehingga semua galur tanaman tumbuh dengan baik. Hal ini ditunjukkan oleh data rata-rata tinggi tanaman selama 4 (empat) minggu pengamatan. Galur yang tumbuh lebih baik adalah GM 2 dan Lumut. Galur GM 2 memiliki pertumbuhan terbaik dan memiliki rata-rata tinggi tanaman tertinggi, yaitu 53,6 cm pada minggu keempat setelah tanam. Tanaman kedelai transgenik galur GM5, menunjukkan pertumbuhan yang kurang baik pada media C dan D. Hal ini disebabkan kondisi tanaman yang terserang penyakit (virus), sehingga tanaman tidak dapat tumbuh dengan baik. Namun galur ini masih lebih baik dibandingkan galur GM14. Galur kedelai transgenik GM14 menunjukkan pertumbuhan yang paling merana (tinggi tanaman terendah) pada media C dan D di antara keempat galur transgenik. Seluruh tanaman galur GM14 terserang penyakit (virus) paling parah, sehingga tanaman tidak dapat tumbuh normal.

Hasil analisis PCR terhadap 13 sampel DNA tanaman kedelai T2 galur GM2, GM5, GM10 dan GM14 menunjukkan bahwa keempat galur tersebut menghasilkan pita DNA berukuran 160 pb, sama dengan ukuran DNA pada sampel plasmid yang mengandung gen *MaMt2* (kontrol). Hal ini berarti tanaman tersebut positif mengandung gen *MaMt2*.

Tanaman kedelai yang menunjukkan toleransi Al dan mengandung gen *MaMt2*, khususnya yang dapat tumbuh pada media perlakuan A dipelihara terus hingga dewasa untuk menghasilkan benih kedelai T3 *MaMt2*. Tanaman kedelai dari galur GM 2, GM 5, dan GM 10 dapat bertahan hidup hingga dewasa dan menghasilkan polong serta biji T3, yaitu sebanyak 50 biji (GM 2), 8 biji (GM 5) dan 30 biji (GM 10). Sedangkan tanaman dari galur GM 14 tidak dapat bertahan hidup dan tidak menghasilkan biji T3 (Pardal & Suharsono 2017). Uji lanjut galur kedelai T3 dan T4 menunjukkan hasil yang sama, tiga galur kedelai transgenik masih membawa gen *MaMt2* dan hasil uji fenotik toleran terhadap tanah masam dengan pH 3,7 (Haerunisa 2015 tidak dipublikasikan).

PENUTUP

Perakitan varietas kedelai unggul melalui rekayasa genetik memungkinkan untuk dilakukan di Indonesia, namun masih banyak tantangan yang harus dihadapi di antaranya rendahnya persentase keberhasilan regenerasi tanaman, ketersediaan konstruksi gen untuk sifat yang diinginkan dan regulasi tentang pelepasan produk rekayasa genetik yang sangat ketat, panjang dan mahal, sehingga hingga saat ini baru satu jenis PRG kedelai yang berhasil dikomersialkan secara global, yaitu kedelai toleran herbisida (*Roundup Ready Soybean*).

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraito YU. 2012. Transformasi genetik *Nicotiana benthamiana* L., dan kedele dengan gen *MaMt2* penyandi metallothionein tipe II dari *Melastoma malabathricum* L. [Disertasi S3]. Bogor (Indonesia): Sekolah Pascasarjana IPB.
- Clive James. 2018. Brief 53: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017. © 2018 International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).
- Hannum S. 2012. Isolasi dan analisis ekspresi gen toleran aluminium pada *Melastoma malabathricum* L. [Disertasi S3]. Bogor (Indonesia): Sekolah Pascasarjana IPB.
- Huang GY, Wang YS. 2010. Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicenia marina*) in response to metal stress. *Aquat. Toxicology* 99: 86-92.
- Jamil A, Mejana MJ, Praptana RH, Subekti NA, Aqil M, Musaddad A, Putri F. 2016. Deskripsi Varietas Unggul Tanaman Pangan. Puslitbangtan. 142 hlm.
- Monsantoglobal. (2000) 'Roundup Ready ® Cotton: Food & Feed Safety'. *Insight Biotechnology*. p.1-2.
- Monsanto. (2018). Monsanto stops Bt GMO soybean launch in U.S. *GMO News, The Non-GMO E-Newsletter*. Published: June 7, 2018.
- Muhaemin. 2008. Analisis pertumbuhan *Melastoma* (*Melastoma malabathricum* auct. Non L dan *M. affine* D. Don) yang mendapat cekaman pH rendah dan aluminium. [Tesis]. Bogor (Indonesia): Sekolah Pascasarjana IPB.
- Mulyani A, Rachman A, Dairah A. 2009. Penyebaran lahan masam, potensi dan ketersediaannya untuk pengembangan

- pertanian. Buku Fosfat Alam. Balittanah, Badan Litbang Pertanian. www.balittanah.litbang.pertanian.go.id
- Mutiasari A. 2008. Akumulasi aluminium pada *Melastoma affine* dan *M. malabathricum*. [Tesis]. Bogor (Indonesia): Sekolah Pascasarjana IPB.
- Pardal SJ, Wattimena GA, Aswidinnoor H, Herman M. 2004. Transfer gen *proteinase inhibitor* II pada kedelai melalui *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap penggerek polong (*Etiella zinckenella*). J Bioteknologi Pertanian. 24:20-28.
- Pardal SJ, Wattimena GA, Aswidinnoor H, Herman M. 2005. Transformasi genetik kedelai dengan gen *proteinase inhibitor* II menggunakan teknik penembakan partikel. J AgroBiogen. 1:53-61.
- Pardal SJ, Suharsono, Anggraito YU, Widyastuti U. 2014. Perakitan kedelai transgenik toleran terhadap lahan masam. Laporan Akhir KKP3N Balitbangtan. 20 hlm.
- Pardal SJ, Suharsono. 2016. Evaluasi galur kedelai transgenik toleran Aluminium di Fasilitas Uji Terbatas. J Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 35:169-175.
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M, 2009. Physiological functions of beneficial elements. Curr Opin Plant Biol. 12:267-274.
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Horst WJ, Delhaize E. 2009. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. Plant Physiol. 149:340-351.
- Suharsono, Yusuf M. 2006. Isolasi dan karakterisasi gen-gen yang berhubungan dengan toleransi tanaman terhadap pH rendah

dan aluminium tinggi. Laporan Penelitian HPTP. LPPM-Institut Pertanian Bogor.

- Suharsono, Trisnaningrum N, Sulistyaningsih LD, Widyastuti U. 2009. Isolation and cloning of fragment of cDNA of gene encoding for multidrug resistance associated protein from *Melastoma affine*. *Biotropia*. 9:27-36.
- Tasma IM, Warsun A, Satyawan D, Pardal SJ, Slamet. 2016. Genetic mapping of SSR markers in eight soybean chromosomes based on F2 population B 3462 × B 3293. *J AgroBiogen*. 1:69-75.
- Trisnaningrum N, Yunus M, Suharsono. 2009. Expression of gene encoding for metallothionein from *Melastoma affine*. Postgraduate GP Education Workshop, Ibaraki University, Japan, January 12-13.
- Usha B, Prashanth SR, Parida A. 2007. Differential expression of two metallothionein encoding gene during heavy metal stress in the mangrove species, *Avicenia marina* (Forsk.) Vierh. *Curr Sci*. 93:1215-1219.
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M. 2008. Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signal Behav*. 3:603-605.