

Evaluasi Galur Kedelai Transgenik Toleran Aluminium pada Fasilitas Uji Terbatas

Evaluation for Tolerance of Transgenic Soybean Lines to Aluminum in Biosafety Containmentment

Saptowo J. Pardal¹ dan Suharsono²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia

E-mail: s_j_pardal@yahoo.com

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
Jl. Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Naskah diterima 24 November 2015, direvisi 22 Juni 2016, disetujui diterbitkan 27 Juni 2016

ABSTRACT

Some acid soil is potential for the agricultural development. Constraints for soybean production in the acid soils are Aluminum toxicity and macro nutrient deficiencies. Breeding for soybean varieties tolerant to acid soil is needed. This could be made through genetic engineering, by inserting acid tolerance genes into a soybean genome. Thirty one soybean lines (T0) had been obtained by insertion of Al tolerance genes (MaMt2) through an Agrobacterium mediated transformation, which nine of them contained MaMt2 gene based on PCR test. Further evaluation of those lines was carried out in the Biosafety Containmentment, where four T1 soybean lines were carrying MaMt2 gene, namely line GM2, GM5, GM10 and GM14. The study was aimed to evaluate the degree of tolerance of T2 generation of GM2, GM5, GM10 and GM14 lines to Al toxicity. Results showed that T2 line were able to grow in hygromycin media, indicating that those T2 lines were containing hygromycin resistant gene (hptII). Phenotypic analysis of T2 lines in four acid soil media treatments indicated that all lines could survive and grow on acid soil without liming and adding compost. GM2 line grew best on the acid medium than did other lines.

Keywords: *Transgenic soybean, Al tolerance, phenotypic and molecular evaluation.*

ABSTRAK

Sebagian lahan masam memiliki potensial untuk perluasan lahan pertanian. Kendala utama pengembangan kedelai di lahan masam antara lain keracunan Al dan defisiensi hara. Pengapuran kurang ekonomis dan pengaruhnya mudah hilang sehingga diperlukan varietas kedelai toleran lahan masam. Perakitan kedelai toleran lahan masam dapat dilakukan melalui rekayasa genetik dengan menyisipkan gen toleran aluminium (Al), gen *MaMt2* dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam genom kedelai. Sebanyak 31 tanaman kedelai T0 telah dihasilkan melalui insersi gen toleran Al menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens* dan sembilan galur diantaranya positif mengandung gen *MaMt2* berdasarkan hasil uji PCR. Selanjutnya, pada pengujian lebih lanjut

galur tersebut di fasilitas uji terbatas diperoleh empat galur T1 yang masih membawa gen *MaMt2*, yaitu GM2, GM5, GM10 dan GM14. Keempat galur ini digunakan dalam penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toleransi terhadap Al dari empat galur kedelai T2 (GM2, GM5, GM10 dan GM14) yang berasal dari galur T1 secara fenotipik dan genetik (molekuler). Tahapan pengujian meliputi uji kepekaan benih T1 terhadap higromisin, uji toleransi tanaman T2 terhadap cekaman Al pada fasilitas uji terbatas, dan konfirmasi gen *MaMt2* pada tanaman T2. Hasil penelitian menunjukkan keempat galur T2 yang diuji berkecambah pada medium higromisin, artinya semua galur tersebut membawa gen ketahanan higromisin (*hptII*). Kemudian hasil uji fenotipik tanaman T2 menggunakan empat media tumbuh dengan pH dan kandungan Al berbeda menunjukkan keempat galur kedelai T2 hanya dapat tumbuh pada media tanah dengan perlakuan Al (tanpa kapur dan kompos). Pertumbuhan galur GM2 lebih baik daripada GM5, GM10 dan GM14.

Kata kunci: Kedelai transgenik, toleransi Al, karakter fenotipik, molekuler.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, kedelai merupakan pangan utama setelah padi. Kebutuhan kedelai terus meningkat setiap tahun, sedangkan produksi nasional masih rendah, yang tidak mencukupi semua kebutuhan (Tasma *et al.* 2015). Salah satu kendala yang dihadapi adalah rendahnya produktivitas kedelai dan semakin berkurangnya areal tanam kedelai akibat alih fungsi lahan, terutama di pulau Jawa (Anggraito 2012).

Laju alih fungsi lahan pertanian yang tinggi di Pulau Jawa, sebagai daerah penghasil utama produk pertanian, termasuk kedelai, menjadi salah satu ancaman bagi keberlanjutan penyediaan bahan pangan. Pada sisi lain, Indonesia masih memiliki lahan marjinal (suboptimal) yang potensial dijadikan lahan pertanian (Prasetyo dan Suriadikarta 2006). Namun tanah ini

umumnya masam, kejenuhan basa rendah, kandungan Al berpotensi meracuni tanaman, kandungan bahan organik rendah, kahat hara tertentu seperti P, Ca, Mg, N dan K (Sopandie 2006, Prasetyo dan Suriadikarta 2006, Mulyani *et al.* 2009).

Aluminium (Al) merupakan unsur ketiga terbanyak yang terdapat di bumi setelah oksigen dan silikon. Pada taraf tertentu, Al yang ada di tanah menjadi faktor pembatas pertumbuhan tanaman pada lahan masam (Pilon-Smits *et al.* 2009). Pemberian kapur pada tanaman kedelai kurang ekonomis karena unsur ini cepat hilang pengaruhnya. Oleh karena itu diperlukan varietas kedelai toleran lahan masam dengan kelarutan logam tinggi untuk dikembangkan pada lahan-lahan masam, terutama di luar Jawa (Anggraito 2012).

Perakitan varietas kedelai toleran Al dapat melalui proses penapisan, seleksi, dan persilangan. Namun hingga saat ini belum ada varietas kedelai toleran Al atau yang dapat beradaptasi dan memproduksi tinggi pada lahan masam. Alternatif yang dapat digunakan untuk merakit varietas kedelai toleran lahan masam adalah melalui bioteknologi atau rekayasa genetik, dengan cara menyisipkan gen toleran lahan masam ke tanaman kedelai budi daya (Suharsono dan Yusuf 2006).

Harendong (*Melastoma malabatricum*) merupakan tanaman yang mampu tumbuh pada lahan dengan pH rendah dan kelarutan Al tinggi, sehingga potensial digunakan sebagai sumber gen toleransi terhadap cekaman pH rendah dan Al tinggi (Muhaemin 2008). Tanaman ini memiliki kemampuan tinggi untuk menyerap dan mengakumulasi Al pada daun, terutama pada sel-sel epidermis atas dan mesofil, dan pada seluruh jaringan akar, sehingga tanaman ini disebut akumulator Al (Watanabe *et al.* 2008). Mutiasari (2008) melaporkan tanaman *M. affine* D. Don. atau *M. malabathricum* yang ditumbuhkan pada media cair dengan pH 4,0 dan 3,2 mM Al dapat mengakumulasi 8,81 g Al/kg yang terdapat dalam daun tua selama dua bulan.

Salah satu gen toleransi terhadap pH rendah dan Al tinggi adalah *MaMt2*. Gen penghasil senyawa metalothionein ini diisolasi dari *M. malabatricum*. Gen berasal dari transkripsi balik mRNA *M. malabatricum* yang telah diisolasi, dikarakterisasi, dan diklon ke dalam plasmid pGEMT-easy (Suharsono *et al.* 2009a), kemudian disisipkan ke dalam vektor ekspresi pIG6 dalam bakteri *A. tumefaciens*. Konstruksi ekspresi berlebih untuk gen *MaMt2* dilakukan dengan menggabungkan pada promoter kuat Ubiquitin 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 dapat memproduksi protein target yang tidak bergantung pada senyawa-senyawa penginduksi atau kondisi lingkungan yang ada (Hannum 2012).

Pada penelitian terdahulu (Anggraito 2012) telah dilakukan transformasi gen toleransi terhadap Al (gen *MaMt2*) dari tanaman harendong ke tanaman kedelai varietas Lumut dan menghasilkan 31 galur kedelai hasil regenerasi (T0). Sembilan di antara galur tersebut mengandung gen *MaMt2* dan setelah ditanam di rumah kaca fasilitas uji terbatas (FUT) diperoleh empat galur (*event*) T1 yang positif mengandung gen *MaMt2*, yaitu GM2, GM5, GM10, dan GM14 (Anggraito 2012). Selanjutnya, galur T1 tersebut diselfing dan menghasilkan benih T2 (Pardal *et al.* 2014) yang perlu dievaluasi lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh integrasi gen *MaMt2* terhadap morfologi tanaman dan toleransinya terhadap cekaman Al pada tanah masam (pH rendah).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toleransi empat galur kedelai T2 (GM2, GM5, GM10 dan GM14) yang berasal dari galur T1 secara fenotipik dan genetik (molekuler) terhadap Al.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca pada Fasilitas Uji Terbatas (FUT), dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (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. Varietas Lumut, Sindoro, dan Tanggamus digunakan sebagai kontrol. Lumut merupakan varietas kedelai yang peka terhadap Al (kontrol negatif) yang merupakan tetua dari keempat galur kedelai transgenik tersebut sedangkan Sindoro dan Tanggamus merupakan varietas toleran terhadap 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*.

1. Uji Higromisin

Pengujian dilakukan pada ruang gelap di Laboratorium Biologi Molekuler, BB Biogen, Bogor, pada tahun 2015, untuk mengetahui galur kedelai T2 yang diuji bersifat homosigot. Bahan yang diuji adalah benih empat galur kedelai transgenik T1 (GM2, GM5, GM10 dan GM14), masing-masing 20 biji. Bahan lain yang digunakan adalah antibiotik higromisin, cawan petri diameter 10 cm, ember plastik hitam ukuran 5 kg (diameter 30 cm), kertas saring diameter 10 cm, dan akuades.

Pengujian mengikuti metode Pardal *et al.* (2014) menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua ulangan. Konstruksi gen *MaMt2* yang disisipkan ke dalam kedelai membawa gen *hptII*, yaitu gen tahan antibiotik higromisin (Suharsono *et al.* 2009b). Biji kedelai T2 dari masing-masing galur diambil 20 biji, kemudian diuji daya kecambahnya pada dua *petridish* yang berisi larutan higromisin 25 mg/l (10 biji/petridish). Sebagai kontrol, benih kedelai T2 juga dikecambahkan pada *petridish* yang berisi akuades (tanpa higromisin). *Petridish* yang berisi benih kedelai selanjutnya diletakkan di dalam bak plastik dan ditutup dengan aluminium foil atau kain hitam, lalu disimpan di ruang gelap.

Parameter yang diamati adalah jumlah benih kedelai yang berkecambah. Pengamatan dilakukan dua kali, yaitu pada dua dan empat hari setelah inkubasi (perkecambahan). Kriteria pengamatan dan ketahanan terhadap higromisin adalah jika semua biji dapat berkecambah dengan baik (normal), sehingga kelompok biji tersebut dinyatakan homosigot. Sebaliknya, jika terdapat satu saja biji yang tidak berkecambah, maka benih tersebut bersifat heterosigot. Kelompok benih kedelai T2 yang homosigot selanjutnya digunakan untuk uji toleransi terhadap Al dan pH rendah menggunakan tanah masam di rumah kaca.

2. Uji Toleransi terhadap Al

Pengujian dilakukan di rumah kaca pada Fasilitas Uji Terbatas (FUT) BB Biogen, Bogor, pada tahun 2015, untuk mengetahui toleransi galur kedelai transgenik terhadap Al. Bahan yang diuji adalah empat kecambah dari empat galur kedelai GM2, GM5, GM10 dan GM14 yang dapat berkecambah pada media Higromisin. Uji toleransi dilakukan dengan cara menanam kecambah dari keempat galur transgenik pada empat macam media tumbuh perlakuan Al, yaitu media A, B, C dan D menggunakan rancangan acak kelompok dengan empat ulangan. Media tanah ditempatkan dalam polibag (4 kg tanah/polibag).

Komposisi media tanah adalah sebagai berikut: (1) media A berisi 4 kg tanah masam dari Jasinga, Bogor,

ditambah 3 g pupuk NPK; (2) media B berisi 4 kg tanah masam Jasinga, ditambah 3 g NPK dan 25 g kompos; (3) media C berisi 4 kg tanah masam Jasinga, ditambah 3 g NPK, 25 g kompos, dan 6 gram kapur, dan (4) Media D berisi 4 kg tanah biasa ditambah 3 gram NPK dan 25 gram kompos. Sebelum digunakan, keempat media tersebut dianalisis kandungan tanahnya di Balai Penelitian Tanah (Balittanah) Bogor. Hasil analisis disajikan pada Tabel 1.

Parameter yang diamati adalah tinggi tanaman, jumlah daun kuning, jumlah bunga, jumlah polong, dan jumlah biji. Tinggi tanaman diamati setiap minggu selama satu bulan (4 minggu) sejak tanam untuk mengetahui laju pertumbuhan tanaman. Sebagai kontrol varietas peka Al digunakan kedelai nontransgenik varietas Lumut, sedangkan sebagai kontrol toleran digunakan varietas Sindoro. Kecambah kedelai T2 yang dapat tumbuh pada tanah masam (mengandung Al dan pH rendah) dirawat hingga dewasa dan dibiarkan menyerbuk sendiri (*selfing*) untuk menghasilkan benih kedelai T3.

3. Deteksi Gen *MaMt2*

Analisis molekuler dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler, BB Biogen, Bogor, pada tahun 2015, untuk mengetahui keberadaan gen *MaMt2* pada tanaman kedelai T2 toleran Al. Bahan yang digunakan adalah tanaman dari empat galur kedelai transgenik T2 (GM2, GM5, GM10, GM14) yang toleran Al, yaitu tanaman kedelai yang dapat tumbuh pada media A. Bahan lain yang digunakan adalah perangkat untuk ekstraksi DNA (Invitrogen, USA) dan uji PCR, sepasang primer gen *MaMt2*, marka DNA (1 Kb leader), agarosa, dan akuades steril.

Analisis molekuler menggunakan metode Pardal *et al.* (2004a). Tahapan analisis meliputi isolasi/ekstraksi DNA, *running* PCR, gel elektroforesis, visualisasi hasil elektroforesis, dan analisis data pita DNA. Pada tahap ekstraksi DNA, daun kedelai disampling pada saat tanaman berumur 2 minggu setelah tanam. DNA kedelai diekstraksi dari sampel daun menggunakan *miniprep extraction kit* (Invitrogen-USA). DNA hasil ekstraksi

Tabel 1. Karakteristik tanah yang digunakan sebagai media tumbuh untuk uji toleransi tanaman kedelai T2 terhadap Al.

Media tanah	Asal tanah	pH		Bahan organik			KCl 1N	
		H ₂ O	KCl	C	N	C/N	Al ³⁺	H ⁺
A	Jasinga	4,8	3,8	0,28	0,03	9	5,02	0,68
B	Jasinga	5,0	4,4	3,18	0,37	9	0,62	0,33
C	Jasinga	8,1	7,6	2,64	0,25	11	0,00	0,11
D	Cimaggu	7,0	6,2	1,89	0,24	8	0,00	0,02

Pengujian dilakukan di laboratorium Balai Penelitian Tanah, Bogor.

dianalisis untuk mengetahui keberadaan gen *MaMt2* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan sepasang primer spesifik gen *MaMt2*. Prosedur PCR mengikuti protokol dari *Amplification Kit PCR (Invitrogen-USA)*. Hasil PCR diseparasi pada gel elektroforesis, kemudian divisualisasikan dengan alat *GelDoc*. Sampel tanaman kedelai disebut positif mengandung gen *MaMt2* jika diperoleh pita DNA berukuran 160 pb, setara dengan gen *MaMt2*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Higromisin

Hasil uji kepekaan terhadap highromisin berdasarkan pengamatan pada hari keempat setelah tanam menunjukkan seluruh benih dari keempat galur kedelai transgenik (GM2, GM5, GM10, GM14) berkecambah dengan baik pada media higromisin maupun akuades (kontrol), walaupun terdapat perbedaan pada panjang akar dan warna kecambah (Tabel 2). Akar kecambah pada media higromisin rata-rata lebih pendek dibandingkan dengan kecambah pada media air (1:3) dan warna kecambah lebih pucat (Gambar 1). Hal ini disebabkan karena kecambah kedelai transgenik mengandung gen ketahanan antibiotik higromisin, *hptII*, sehingga dapat berkecambah pada media higromisin 25 mg/l. 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 pada media higromisin, tetapi dapat berkecambah 100% pada media air (Tabel 2). Hal ini disebabkan karena benih kedelai nontransgenik tidak memiliki gen ketahanan terhadap higromisin.

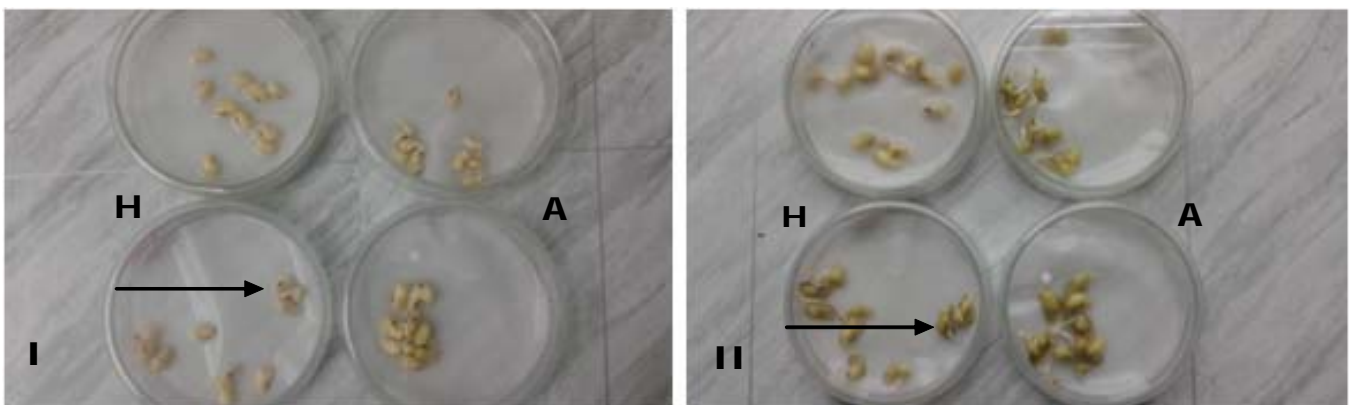
2. Uji Toleransi Al

Secara umum semua galur kedelai transgenik dapat tumbuh pada empat media perlakuan Al, namun kurang baik akibat kemasaman tanah, terutama pada media A. Dari 10 kecambah kedelai T2 hasil uji higromisin yang ditanam pada media perlakuan, tidak semuanya tumbuh menjadi tanaman. Hal ini disebabkan oleh adanya pengaruh senyawa antibiotik higromisisn pada kecambah dan adanya pengaruh tanah masam, sehingga jumlah sampel atau ulangan tanaman untuk setiap galur pada pengujian Al hanya empat. Pertumbuhan tanaman kedelai pada media A kurang bagus dibandingkan dengan media lainnya, yang

Tabel 2. Perkecambahan benih galur T2 dan varietas kedelai pada larutan higromisin dan air (4 HSP). FUT BB Biogen, Bogor. 2015.

Galur T2/ varietas kontrol	Jumlah benih berkecambah (%) pada media:			
	Higromisin (25 mg/l)		Akuades (tanpa higromisin)	
	Rata-rata	%	Rata-rata	%
GM 2	10	100	10	100
GM 5	10	100	10	100
GM 10	10	100	10	100
GM 14	10	100	10	100
Lumut	1	10	10	100
Sindoro	0	0	10	100
Tanggamus	1	10	10	100

Benih galur kedelai transgenik GM 2, GM 5, GM 10, dan GM 14 transgenik berkecambah 100% pada media larutan higromisin 25 mg/l, namun panjang akar lebih pendek (1:3) dan warna kecambah lebih pucat dibandingkan akar kecambah pada media akuades (kontrol).



Gambar 1. Pertumbuhan benih kedelai GM2 yang dikecambahkan pada cawan petri berisi media larutan higromisin 25 mg/l (H) dan media akuades (A). FUT BB Biogen, Bogor. 2015.

I = kecambah kedelai GM2 umur 2 hari setelah dikecambahkan pada H, akar masih pendek,

II = kecambah kedelai GM2 umur 4 hari setelah perkecambahan akar memanjang, namun lebih pendek dibanding media kontrol (air).

ditandai oleh jumlah daun lebih sedikit dan berwarna kekuningan.

Hasil analisis terhadap empat jenis tanah perlakuan Al (media A,B, C, dan D) sebelum ditanami menunjukkan 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%. 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 tanaman dari keempat galur kedelai transgenik T2 dapat tumbuh. Pada empat minggu setelah tanam, galur GM 10, GM 2, dan varietas Sindoro menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik. 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. Gen *MaMt2* pada galur kedelai T2 menyebabkan tanaman dapat mengeksresikan senyawa metalothionein (MT) 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 pada daun, terutama pada sel-sel epidermis atas dan mesofil, serta pada seluruh jaringan akar.

Eksresi gen *MaMt2* pada tanaman diregulasi oleh berbagai faktor, di antaranya oleh cekaman logam berat (Usha *et al.* 2007, Huang and Wang 2009, 2010). Hal ini menunjukkan senyawa metalothionein dieksresikan pada akar sebagai tanggap toleransi terhadap cekaman Al. Hal serupa juga dilaporkan oleh Trisnaningrum (2009), bahwa cekaman Al terhadap *Melastoma affine* pada konsentrasi 3,2 mM meningkatkan 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 metalothionein 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 pengkelatan logam Al oleh *metalothionein*, tetapi melihat kemampuan gugus sulfhidril mengikat logam-logam bivalen (Cu, Zn, Mn, Cd, dsb.) maka kemungkinan protein metalothionein juga mampu mengkelat Al, meskipun dalam jumlah molekul yang lebih rendah. Untuk itu perlu

dilanjutkan ujiantang dengan berbagai konsentrasi Al untuk mengetahui kerja protein MT dalam mengkelat logam Al.

Pada media B yang berisi tanah masam ditambah dengan kompos, galur-galur kedelai transgenik tidak dapat tumbuh dengan baik. Hal ini dapat dilihat dari tinggi tanaman. Kompos yang ditambahkan ternyata belum mampu 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 terinfeksi penyakit, sehingga pertumbuhannya tidak optimal. Galur yang tumbuh lebih baik adalah Sindoro dan GM 5. Tanaman tertinggi dilanjutkan oleh galur/varietas Sindoro (29,8 cm), GM 5 (21,6 cm), dan GM 10 (20,1 cm) (Gambar 2).

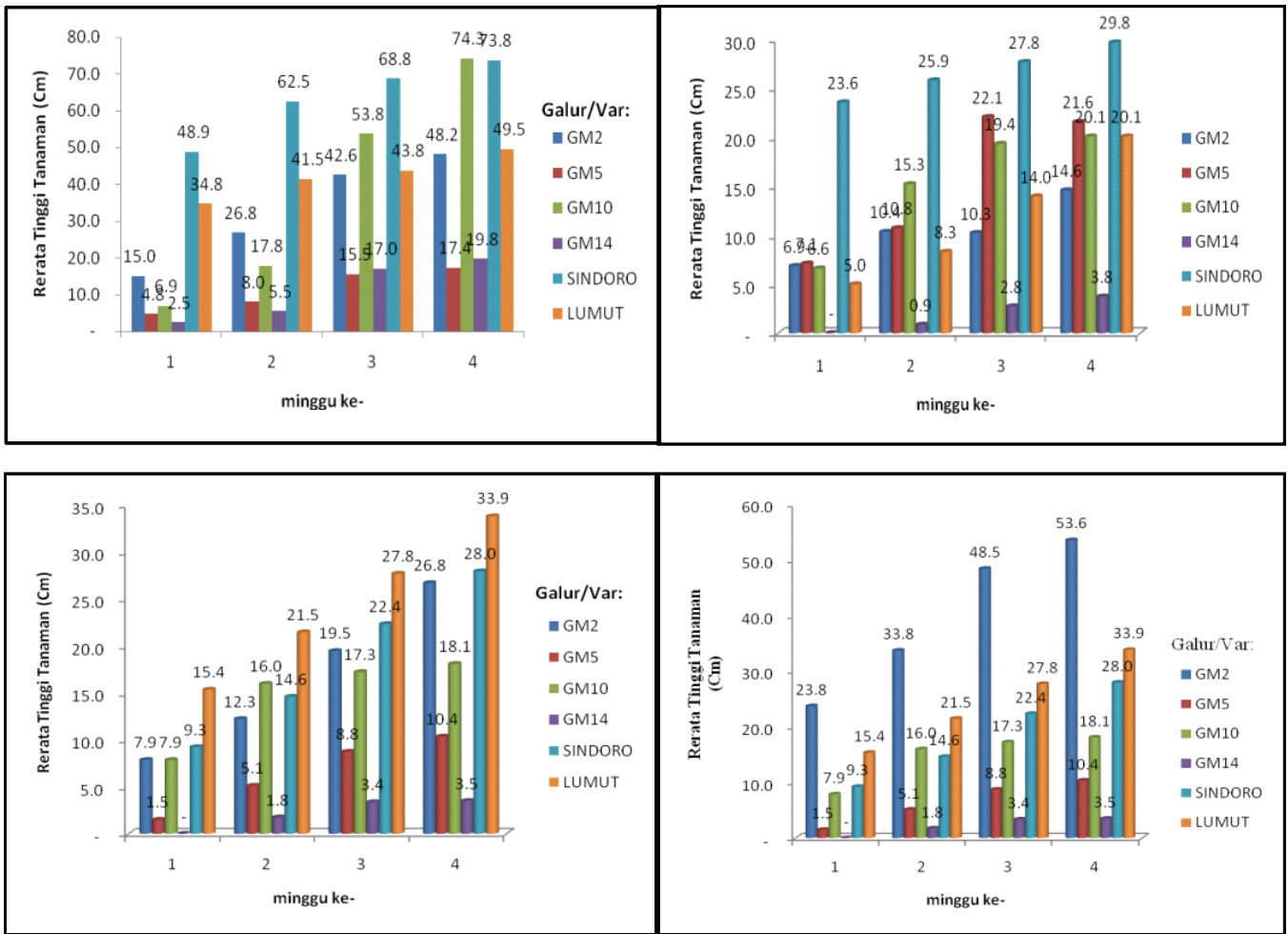
Pada media C, galur-galur kedelai transgenik juga tidak dapat tumbuh dengan baik, kecuali galur GM 2, varietas Lumut, dan Sindoro (Gambar 2). Pada media ini, tanah masam ditambah dengan kompos dan kapur. Kapur yang ditambahkan meningkatkan pH tanah (hasil analisis tanah C menunjukkan pH 8,1 dan kandungan 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 (nonmasam) ditambah kompos dan NPK memiliki pH 7 (normal) dan kandungan Al^{3+} terlarut 0,0 cmol/kg, sehingga semua galur tumbuh dengan baik. Hal ini ditunjukkan oleh tinggi tanaman selama 4 minggu pengamatan. Galur yang tumbuh lebih baik adalah GM 2 dan Lumut. Galur GM 2 memiliki pertumbuhan terbaik dengan rata-rata tanaman tertinggi (53,6 cm) pada minggu keempat setelah tanam (Gambar 2).

Kedelai transgenik galur GM5 menunjukkan pertumbuhan yang kurang baik pada media C dan D. Hal ini disebabkan oleh kondisi tanaman yang terinfeksi penyakit (virus). Namun galur ini masih lebih baik dibandingkan dengan galur GM14. Galur kedelai transgenik GM14 menunjukkan pertumbuhan yang paling merata (tinggi tanaman terendah) pada media C dan D. Seluruh galur GM14 terinfeksi penyakit (virus) paling parah, sehingga tanaman tidak dapat tumbuh normal (Gambar 2).

3. Deteksi Gen *MaMt2*

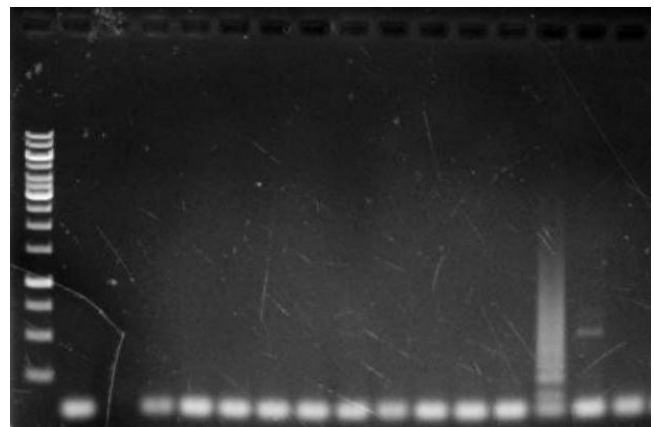
Pada uji toleransi kedelai transgenik T2 galur GM 2, GM 5, GM 10, dan GM 14 terhadap Al diperoleh beberapa tanaman yang dapat bertahan hidup (tumbuh) pada media yang mengandung Al, khususnya media A yang berisi tanah masam Jasinga (pH 4,8) dan 3 g NPK.



Gambar 2. Histogram pertumbuhan kedelai transgenik dan kontrol pada empat macam media tumbuh (A – D) hingga empat minggu setelah tanam. FUT BB Biogen, Bogor, 2015.

Analisis PCR terhadap 13 sampel DNA kedelai T2 galur GM2, GM5, GM10 dan GM14 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* (Gambar 3).

Tanaman kedelai yang menunjukkan toleransi terhadap 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 masing-masing sebanyak 50 biji (GM 2), delapan biji (GM 5), dan 30 biji (GM 10). Tanaman dari galur GM 14 tidak dapat bertahan hidup dan tidak menghasilkan biji T3. Biji kedelai T3 akan digunakan sebagai materi pengujian lebih lanjut.



Gambar 3. Foto gel elektroforesis sampel DNA hasil PCR tanaman DNA galur kedelai T2. M = 1 kb DNA ladder (Marka DNA); 1 = Kontrol positif (plasmid); 2 = kontrol negatif (air); 3 = GM2 (2); 4 = GM2 (3); 5 = GM2 (4); 6 = GM5 (2); 7 = GM5(3); 8 = GM5(4); 9 = GM10 (1); 10 = GM10 (2); 11 = GM10 (3); 12 = GM10 (4); 13 = GM14 (1); 14. GM14 (2), and 15 = GM14 (4).

KESIMPULAN

Benih galur kedelai transgenik T2 (GM2, GM5, GM10 dan GM14) dapat berkecambah dan tumbuh pada media yang mengandung higrumisin 25 mg/l. Artinya, keempat galur membawa gen ketahanan terhadap higrumisin, *hptII*.

Semua galur T2 yang diuji toleran terhadap media tumbuh yang mengandung Al³⁺ terlarut 5,02 cmol/kg dengan pH 4,8. Semua galur kedelai yang toleran terhadap Al mengandung gen *MaMt2*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui program KKP3N. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Utut Widyastuti dari IPB dan Dr. Yustinus Ulung Anggraito dari Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan materi penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Pratiwi, Endang Ibrahim, dan Riri Sundasari yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraito, Y.U. 2012. Transformasi genetik *Nicotiana benthamiana* L., dan kedele dengan gen *MaMt2* penyandi metallothionein tipe II dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi S3, Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Hannum, S. 2012. Isolasi dan analisis ekspresi gen toleran aluminium pada *Melastoma malabathricum* L. Disertasi S3. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Huang, G.Y. and Y.S. Wang, 2009. Expression analysis of type 2 metallothionein gene in mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) under heavy metal stress. *Chemosphere* 77: 1026-1029.
- Huang, G.Y. and Y.S. Wang, 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.
- Muhaemin, 2008. Analisis pertumbuhan *Melastoma (Melastoma malabathricum* auct. Non L dan *M. affine* D. Don) yang mendapat cekaman pH rendah dan aluminium. Tesis. Program Pascasarjana, IPB.
- Mulyani, A., A. Rachman, dan A. Dairah, 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. Program Pascasarjana, IPB.
- Pardal, S.J., Suharsono, Y.U. Anggraito, dan U. Widyastuti. 2014. Perakitan kedelai transgenik toleran terhadap lahan masam. Laporan Akhir KKP3N Balitbangtan. 20 halaman.
- Pilon-Smits, E.A.H, C.F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, and M. Schiavon, 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opinon in Plant Biology* 12:267-274.
- Prasetyo, B.H., D.A. Suriadikarta, 2006. Karakteristik, potensi dan teknologi pengelolaan tanah ultisol untuk pengembangan pertanian lahan kering di Indonesia. *J. Litbang Pertanian* 25(2): 39-46.
- Ryan, P.R., H. Raman, S. Gupta, W.J. Horst, and E. Delhaize. 2009. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol.* 149:340-351.
- Sopandie, D. 2006. Perspektif fisiologi dalam pengembangan tanaman pangan di lahan marginal. Orasi ilmiah Guru Besar. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. 121p.
- Suharsono dan M. Yusuf. 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. 2007. Pembuatan pustaka genom kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) kultivar lumut di dalam fage lambda. *Biosfera* 24(2):83-90.
- Suharsono, S. Firdaus, dan U. Widyastuti. 2008. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA dari gen penyandi multidrug resistance associated protein dari *Melastoma affine*. *Makara Sains* 12(2):102-107.
- Suharsono, N. Trisnaningrum, L.D. Sulistyaningsih, and U. Widyastuti. 2009a. Isolation and cloning of fragment of cDNA of gene encoding for multidrug resistance associated protein from *Melastoma affine*. *Biotropia* 9(1):27-36.
- Suharsono, Y. Anwar, and U. Widyastuti. 2009b. Isolation and cloning of cDNA of gene encoding for metallothionein type 2 from soybean [*Glycine max* (L.) (Merrill)] cv Slamet. *Biodiversitas* 10 (3): 109-114.
- Tistama, R, U. Widyastuti, D. Sopandie, A. Yokota, K. Akashi, and Suharsono. 2012. Physiological and biochemical responses to aluminum stress in the root of a biodiesel plant *Jatropha curcas* L. Hayati. *J. Bioscience* 19(1):37-43.
- Trisnaningrum, N. 2009. Analisis ekspresi gen penyandi *metallothionein* tipe II pada *Melastoma affine* L. yang mendapat cekaman pH rendah dan aluminium. Tesis. Program Pascasarjana, IPB.
- Trisnaningrum, N., M. Yunus, and Suharsono. 2009. Expression of gene encoding for metallothionein from *Melastoma affine*. Postgraduate GP Education Workshop, Ibaraki University, Japan, January 12-13.
- Usha, B., S.R. Prashanth, and A. Parida, 2007. Differential expression of two metallothionein encoding gene during heavy metal stress in the mangrove species, *Avicenia marina* (Forsk.) Vierh. *Curr. Science* 93(9):1215-1219.
- Watanabe, T., S. Misawa, S. Hiradate, and M. Osaki, 2008. Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator. *Plant Signal & Behav* 3(8):603-605.

