

**UPAYA PENINGKATAN KUALITAS TANAMAN KEDELAI
(*Glycine max L. Merrill*) MELALUI PEMANFAATAN BIOTEKNOLOGI DALAM
MENGATASI KELANGKAAN PANGAN**

*(Efforts to Improve Quality of Soybean Plant (*Glycine max L. Merrill*) Through the
use of Biotechnology in Overcoming Food Scarcity)*

¹⁾Edi Tando dan ²⁾Muh. Afif Juradi

¹⁾Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Tenggara

²⁾Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Tengah

ABSTRACT

Population growth the rapidly is currently a major challenges to business world food supply. The development of biotechnology begins with technology genetically engineered has accelerated. Products of biotechnology plants resembling plants provenance, but having the characteristics of certain that causes those plants better. Plant products of biotechnology which has been approved for food as having the nature of : 1) resistance to pests and disease , 2) resistance to herbicide, 3) nutrition changes and 4) content increased save resources. The purpose of drafting this paper is to provide information about improving the quality of the soybean plant (*Glycine max l .Merrill*) through the use of biotechnology in addressing scarcity of food.The genetically engineered in plants soybean , includes extraction process dna (modification ctab) method of the leaves of plants tangential and soybean R1 R2. Fragments of dna the genome of 0.8 kb involved in tolerant asam-al at b . Japonicum 38 has successfully isolated using inverse PCR technique, Fragments of dna has been successfully diklon into plasmid vector pgemt-easy (~ 3kb) produce recombinant plasmid pgemt-38 a ~ 3.8 family planning. Ttransfer genes pinii in plants soy has successfully done through a . Tumefaciens with one of his event at1 (tidar) showing the pcr positive on pinii genes. Protocol best for soybean through the transformation of a . Tumefaciens is using eksplan cotyledon young with the density of bacteria 1×10^8 / cell mls inoculation / long 90 minutes and long kokultivasi 5 days. The soybean plant ATIR1 (tidar) transformation through a result. Tumefaciens a little more resistant to pest borer rather than the pods the soybean plant nontransgenik (control).

Keyword : quality; biotechnology; soybean.

PENDAHULUAN

TanamanKedelai (*Glycine max L. Merrill*) di Indonesia ialahkomoditas strategis ketiga setelah padi dan jagung, karena setiap hari dikonsumsi hampir sebagian masyarakat dengan tingkat konsumsi rata - rata 8,12 kg/kapita/tahun (Sudaryanto dan Swastika, 2007). Sementara, kebutuhan kedelai akan terus meningkat sejalan dengan bertambahnya jumlah penduduk. Hal ini tercermin dari

permintaan kedelai dalam sepuluh tahun terakhir yang terus meningkat, jauh melampaui produksi dalam negeri. Oleh karena itu upaya peningkatan produksi harus diupayakan melalui perluasan areal tanam (Harsono, 2008).

Pertumbuhan penduduk yang semakin pesat saat ini menjadi tantangan besar bagi usaha penyediaan pangan dunia. Badan pangan dunia atau FAO, memperkirakan akan terjadi kelangkaan

pangan dunia pada tahun 2050. Sektor pertanian sebagai penyedia pangan dituntut lebih produktif dalam mengimbangi tingginya kebutuhan pangan dunia yang meningkat hingga 70%. Suryanegara (2011) menyatakan bahwa salah satu upaya untuk menjawab tantangan tersebut, antara lain melalui penerapan bioteknologi melalui rekayasa genetika.

Perkembangan bioteknologi diawali dengan teknologi rekayasa genetika menjadi semakin cepat. Dalam dogma sentral atau pemahaman dasar ilmu biologi diketahui bahwa cetak biru kehidupan DNA menyimpan informasi yang pemanfaatannya dilakukan melalui perubahan informasi ke materi baru yaitu RNA. Proses ini disebut transformasi. Selanjutnya RNA juga dirubah informasinya ke dalam materi akhir yaitu protein dalam proses translasi. Dari alur informasi dalam dogma sentral itu bisa dipahami bahwa rekayasa DNA/genetika membawa implikasi pada perubahan RNA sebagai materi pertengahan maupun kepada protein sebagai produk akhir.

Rekayasa genetika merupakan usaha manusia dengan sengaja mengubah, memodifikasi dan atau menambahkan susunan suatu gen dengan

material baru kedalam suatu organisme untuk mendapatkan generasi sesuai tujuan yang diinginkan. Rekayasa genetika merupakan solusi untuk mengatasi kelangkaan pangan dengan ditemukannya teknologi tanaman transgenic atau *Genetically Modified Organism (GMO)* (Karmana, 2009).

Tanaman produk bioteknologi telah banyak diperdagangkan di pasar. Tanaman hasil rekayasa genetika tersebut menyerupai tanaman asalnya, tetapi memiliki sifat – sifat tertentu yang menyebabkan tanaman tersebut lebih baik. Tanaman produk bioteknologi yang telah disetujui untuk pangan merupakan tanaman yang direkayasa untuk memiliki sifat seperti : (1) ketahanan terhadap hama dan penyakit, (2) ketahanan terhadap herbisida, (3) perubahan kandungan nutrisi dan (4) peningkatan dayasimpan (Manuhara, 2006)

Tujuan penyusunan makalah ini adalah untuk memberikan informasi tentang upaya peningkatan kualitas tanaman kedelai (*Glycine max L. Merrill*) melalui pemanfaatan bioteknologi dalam mengatasi kelangkaan pangan.

PEMBAHASAN

Peranan Bioteknologi

Bioteknologi didefinisikan sebagai penerapan prinsip - prinsip biologi, biokimia dan rekayasa dalam pengolahan bahan dengan memanfaatkan agensia jasad hidup dan komponen - komponennya untuk menghasilkan barang dan jasa. Bioteknologi selalu berkaitan dengan reaksi - reaksi biologis yang dilakukan oleh jasad hidup sebagai suatu individu atau komponen - komponennya yang dapat berupa organel, sel atau jaringan atau bahkan molekul - molekul tertentu, misalnya DNA, RNA, protein atau enzim. Ilmu yang mendasari bioteknologi ialah mikrobiologi, genetika, biokimia, biologi molekuler, ilmu pangan, rekayasa kimia, rekayasa mekanik, teknologi pangan, elektronik dan computer (Yuwono, 2012)

Melalui upaya memanfaatkan kemajuan bioteknologi seperti rekayasa genetik, gen-gen yang bermanfaat dari sumber yang berbeda seperti bakteri atau spesies tanaman lain yang sama sekali tidak memiliki kekerabatan dapat diisolasi dan gen tersebut dapat dimasukkan ke dalam tanaman yang akan diperbaiki melalui metode transfer genetik (Seraj,

2001). Selanjutnya pemanfaatan teknologi biologi molekuler, gen yang diinginkan dapat dipotong dari suatu genom tanaman dan disambung ke dalam genom lain melalui suatu eksperimen yang unik, tanpa memindahkan gen-gen yang tidak diinginkan selama proses (Fernandes dan Filho, 1993).

Tanaman transgenik merupakan suatu tanaman yang memiliki gen atau telah disisipi gen dari organisme lain, dan dapat pula disebut sebagai *Genetically Modified Organism* (organisme yang termodifikasi secara genetik). Penyisipan gen ini umumnya lebih diarahkan ke tanaman pangan untuk menciptakan kualitas pangan yang lebih baik daripada sebelumnya.

Rekayasa Genetik pada Tanaman Kedelai

Salah satu jenis tanaman produk bioteknologi ialah kedelai. Kedelai merupakan tanaman penghasil minyak yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Bijinya mengandung asam amino esensial lebih tinggi di banding daging, sehingga merupakan tanaman pangan yang sangat penting saat ini.

Rekayasa genetika pada tanaman mencakup beberapa tahapan, yaitu : 1) Ekstraksi DNA, 2) Kloning gen, 3)

Desain gen, 4) Transformasi genetika dan 5) Pemuliaan tanaman di lapangan.

Proses rekayasa genetika pada tanaman kedelai (*Glycine max L. Merrill*), dalam mengatasi kelangkaan pangan saat ini mencakup beberapa tahapan atau proses, antara lain :

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA atau isolasi DNA target merupakan prosedur umum dalam memisahkan dan mengumpulkan DNA untuk analisis rekayasa genetika, forensik, bioinformatika, komputasi, analisis asal-usul dan antropologi. Prinsip dasar Ekstraksi DNA adalah mengeluarkan DNA dari sel.

Hasil penelitian Hadiarto *et al.* , (2002) menunjukkan bahwa proses transfer suatu gen asing ke dalam genom suatu tanaman target dimulai dengan pemasukan gen asing ke dalam sitoplasma sel tanaman target. Selanjutnya gen ini akan masuk ke dalam inti sel tanaman melalui pori - pori membran inti sel. Apabila gen asing tersebut berhasil masuk atau menyisip ke dalam kromosom tanaman target dan berintegrasi dengan baik (berada pada bagian yang aktif ditranskripsi), maka gen itu akan dapat diekspresikan oleh tanaman transforman.

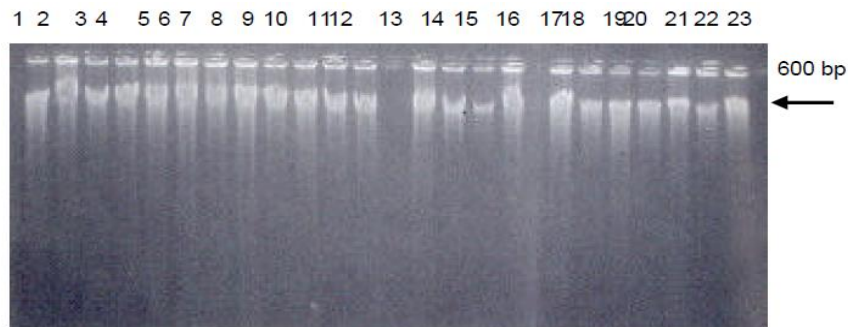
Suatu contoh proses ekstraksi DNA (modifikasi metode CTAB) yaitu DNA diekstrak dari daun tanaman kedelai transgenik R1 dan R2 yang telah ditanam di rumah kaca. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara menggerus kurang lebih 0,5-2 g daun yang telah disimpan dalam ruang gelap bersuhu -20°C dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk halus. Serbuk daun tersebut dipindahkan ke dalam tabung corning dan ditambah dengan bufer ekstraksi 1 M Tris HCl (pH 7,5); 0,5 M EDTA (pH 8); 5 M NaCl; 1% CTAB; 140 mM Na-bisulfite. Campuran tersebut kemudian digoyang perlahan dan disimpan pada inkubator 65°C, selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang selama 4 - 6 menit, ekstraksi kemudian dilanjutkan dengan menambahkan 6 ml chloroform : isoamil-alkohol (24 : 1). Campuran tersebut digoyang kembali selama 20 menit. Setelah supernatan akhir dipisahkan, campuran kemudian ditambahkan 2 vol. 95% EtOH dingin. Setelah dicampur merata, kemudian pelet DNA diambil dengan pipet pasteur dan dipindahkan ke dalam eppendorf 1,5 ml. Endapan DNA dicuci dengan alkohol 70% dingin (2 kali), kemudian dikeringkan dengan mesin evaporator VWR 1410. Endapan DNA

kemudian dilarutkan dalam 1x TE bufer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8). Purifikasi DNA pelet yang diperoleh, dilakukan dengan menambahkan 3 ml RNase dan 3 ml proteinase K (1 mg/ml) 37°C, 60 menit. Kemudian tambahkan 1/10 vol. 3M NaOAc. Tambahkan 2 vol. EtOH absolut, dicampur merata. Pelet DNA dipindahkan ke eppendory baru, kemudian dicuci dengan EtOH 70% (v/v), selanjutnya dikeringkan dan dilarutkan dalam TE (1 kali) dan disimpan dalam suhu -20°C.

DNA tanaman sampel yang telah dimurnikan digunakan untuk analisis PCR. Volume yang digunakan dalam PCR untuk 1 kali reaksi adalah 25 ml dengan komposisi bahan 1 kali bufer PCR yang mengandung MgCl₂ 0,25 mM; 200 mM dNTP; 100 nM primer forward dan reverse pinII; 1,5 u/ml enzim Taq DNA polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA); 5 ng DNA hasil isolasi dan ddH₂O bebas nuklease ditambahkan agar volume reaksi mencapai 25 ml. Primer yang digunakan untuk mendeteksi gen pinII mempunyai urutan basa forward 5'GCCTTGGGCTCATCACTCTCTCTCCTTCAC-3' dan reverse 5'-GGAAGTTAATTCG TTGCTTACC-3'. Deteksi gen pinII melalui PCR ini

menggunakan mesin PCR Programable Thermal Controller (MJ Research Incorporation, Massachussetts, USA) dalam 35 siklus yang terdiri 94°C selama 5 menit, 94°C selama 1 menit, 55°C selama 2 menit, dan 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi PCR kemudian dipisahkan dengan 0,8% (w/v) elektroforesis agarose gel dan pewarnaan dengan ethidium bromide (McGarvey dan Kaper, 1991; Listanto *et al.*, 1996). Hasil PCR positif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA pada gel hasil elektroforesis pada posisi 600 bp.

DNA total genom berhasil diisolasi dengan baik dari sampel daun tanaman kedelai transgenik R1, R2, dan non transgenik. Hal ini ditunjukkan dengan hasil kemurnian DNA yang telah memenuhi syarat, yaitu sekitar 1,5-2. Kemurnian DNA yang baik untuk uji molekuler berkisar antara 1,6-1,8. Sampel DNA murni hasil ekstraksi tersebut selanjutnya dipisahkan pada gel Agarose elektroforesis (0,8%), kemudian hasilnya difoto dengan film polaroid. Dari hasil foto gel terlihat bahwa DNA semua sampel dapat muncul/terdeteksi. Contoh hasil foto DNA dari beberapa sampel tanaman dapat dilihat pada Gambar 1.



1-23 urutan sampel daun AT1-1 sampai AT1-23, tanda panah Menunjukkan posisi pita DNA sampel

Gambar 1 Foto DNA total dari sampel daun kedelai transgenik R1 event AT1(*Agrobacterium*) pada gel agarose 1%

Sedangkan hasil isolasi DNA seluruh sampel tanaman kedelai transgenik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil isolasi DNA total daun tanaman kedelai transgenic dan non transgenic.

Event Tanaman	Generasi Tanaman	Metode Transformasi	Jumlah Sampel	Hasil DNA
WP2	R1	Penembakan	57	bagus
WP1	R2	Penembakan	18	bagus
TP1	R2	Penembakan	9	bagus
TP2	R2	Penembakan	16	bagus
AT1	R1	Agrobacterium	27	bagus
Wilis	Kontrol	Non Transformasi	1	bagus
Tidar	Kontrol	Non Transformasi	1	bagus

Bagus = Kemurnian DNA antara 1.5 – 2

Sampel DNA ini selanjutnya siap digunakan untuk deteksi gen *pinII* menggunakan teknik PCR.

2. Kloning Gen

Kloning merupakan salah satu langkah yang dapat digunakan untuk mengembangkan tanaman transgenik. Kloning gen bertujuan untuk

memperbanyak gen interest yang diharapkan.

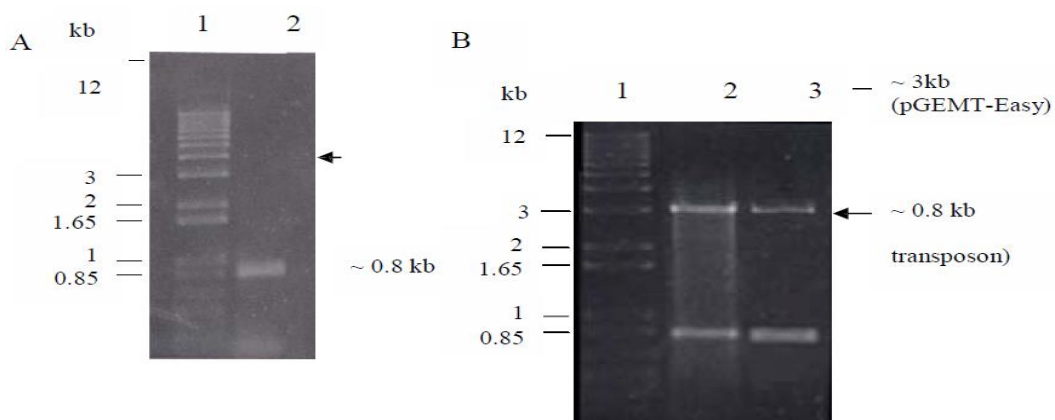
Sebagai contoh dalam tanaman kedelai bahwa efektivitas sistem simbiosis antara bakteri bintil akar (BBA) dengan tanaman legum sangat dipengaruhi oleh kondisi tanah. Dalam simbiosisnya dengan tanaman legum, BBA berperan untuk memfiksasi nitrogen dan

mengubahnya menjadi amonia yang dapat digunakan oleh tanaman. Beberapa galur BBA kedelai tumbuh lambat, *Bradyrhizobium japonicum*, yang efektif dalam menambat nitrogen dapat memenuhi lebih kurang 74% pasokan nitrogen yang dibutuhkan tanaman kedelai (Yutono, 1985). Oleh karena itu, telaah mengenai gen yang bertanggung jawab terhadap sifat toleransi asam-Al tersebut penting diketahui untuk menelaah lebih lanjut respons fisiologi dan karakter molekuler yang berperan dalam sifat toleransi asam-Al pada *B. japonicum*.

Hasil penelitian Astuti *et al.*, (2002) menunjukkan bahwa fragmen DNA genom sebesar 0.8 kb yang terlibat dalam toleran asam-Al pada *B. japonicum*

38 telah berhasil diisolasi dengan menggunakan teknik *inverse* PCR, melalui mutagenesis transposon mini-Tn5Km1. Fragmen DNA tersebut berhasil diklon ke dalam plasmid vector pGEMT-Easy (~3kb) menghasilkan plasmid rekombinan pGEMT-38 yang berukuran ~ 3.8 kb.

Kloning fragmen DNA genom pengapit transposon telah berhasil diligasi kedalam vektor plasmid pGEM-T Easy membentuk plasmid rekombinan pGEMT-38 dan ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α . Koloni putih hasil transformasi setelah diekstrak plasmid rekombinannya, dipotong dengan *EcoRI*, dan dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1%, hasilnya tertera pada Gambar 2.



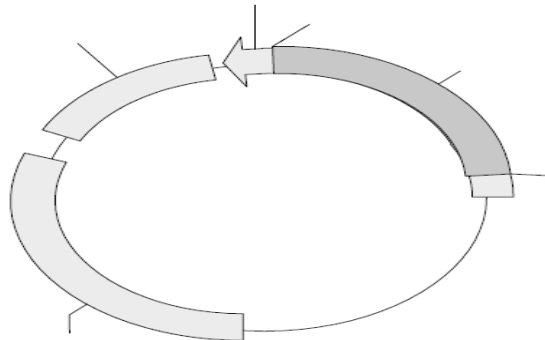
Gambar 2. A) Hasil elektroforesis gel agarosa 1% dari DNA genom pengapit transposon yang diamplifikasi dengan *inverse* PCR dari genom mutan AAS38.

Sumur 1: marker DNA (1 kb ladder *plus*), sumur 2: DNA hasil *inverse* PCR. B) Hasil elektroforesis plasmid pGEMT-38 yang dipotong dengan enzim *EcoRI*. Sumur 2

dan 3 terdapat dua pita yang berukuran ~3 kb (pGEMT-Easy) dan ~0.8 kb (DNA genom pengapit transposon) hasil pemotongan *EcoRI*.

Hasil pemotongan dengan enzim *EcoRI* didapatkan dua pita yang

menunjukkan adanya plasmid vektor pGEM-T (~3 kb) dan DNA sisipan yaitu fragmen DNA genom pengapit transposon yang terlibat dalam toleransi asam-AI (0.8 kb). Peta plasmid rekombinan pGEMT-38 (~3.8 kb) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Peta Plasmid rekombinan pGEMT-38 (~3.8 kb) hasil ligasi fragmen DNA genom yang terlibat dalam toleransi asam-AI (~0.8 kb) dengan pGEMT- Easy (~3kb).

Plasmid rekombinan hasil ligasi antara vektor pGEMT-Easy dengan DNA sisipan merupakan alat penting untuk telaah molekuler lebih lanjut. Plasmid rekombinan yang ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α ini dimaksudkan untuk pembentukan klon, yaitu sel-sel individu yang mengandung molekul DNA rekombinan yang dapat dipropagasi dan disimpan untuk memproduksi molekul DNA rekombinan dalam jumlah besar sehingga dapat digunakan untuk mempelajari karakter fisiologis tertentu ataupun untuk mengkonservasi molekul DNA rekombinan dalam keadaan stabil (Dawson *et al.* 1996). Plasmid

rekombinan ini juga dapat digunakan untuk menganalisis sekuen DNA sisipan (DNA yang terlibat dalam toleransi asam-AI), sehingga dapat ditemukan sekuen homologinya dengan sekuen organisme lain pada *database* GeneBank. Selain itu juga dapat digunakan untuk mengetahui protein yang disandikan oleh sekuen gen tersebut dengan cara membandingkan dan mensejajarkan data urutan asam amino DNA sisipan dengan data GeneBank.

3. Desain Gen

Kegiatan desain gen dilakukan dengan merubah susunan basa dalam area kode (*encode region*) gen yang akan menentukan produksi protein tertentu

yang diinginkan. Dalam rekombinasi DNA dilakukan pemotongan dan penyambungan DNA, melibatkan enzim tertentu. Enzim pemotong yaitu enzim restriksi endonuklease dan enzim penyambung yaitu enzim ligase. Hasil sambungan DNA dikenal sebagai DNA rekombinan. yaitu enzim ligase.

Hasil penelitian Susilawati (2013) menunjukkan bahwa penyakit hawar bakteri (*bacterial blight*) merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman kedelai dan dapat menyebabkan kerugian mencapai 11- 20%. Identifikasi penyebab penyakit perlu dilakukan secara dini agar pengendalian penyakit lebih mengena sasaran. Identifikasi penyebab penyakit hawar bakteri dilakukan yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pada PCR, kespesifikan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR. Patogen penyebab penyakit hawar bakteri diketahui memiliki gen spesifik yaitu gen *coronafacate ligase (cfl)* yang membedakannya dari spesies lain. Kekhususan gen pada bakteri target yang diidentifikasi dapat dijadikan dasar sebagai pembeda antar spesies. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang spesifik terhadap gen *cfl* dan mengamplifikasi sekuensi gen *cfl* dengan

PCR menggunakan primer spesifik yang di desain.

Tahap pertama dalam desain primer dilakukan eksplorasi sekuensi gen *cfl* dari gen Bank NCBI dan diperoleh lima jenis bakteri dari patovar *P. syringae* dan dua jenis bakteri lain yang memiliki gen *cfl*. Perbedaan urutan sekuensi nukleotida dari masing-masing jenis bakteri selanjutnya di uji multiple alignment dengan software ClustalX, dan diperoleh lima patovar *P. syringae* yang memiliki area homologi yang tinggi. Dari lima kandidat patovar *P. syringae* yang diketahui area homologi tertinggi, selanjutnya dipilih satu sekuensi spesifik *P. syringae* pv. *glycinea*. Urutan nukleotida gen *cfl* dari *P. syringae* pv. *glycinea* didesain primernya dengan tool bioinformatika Primer3 dan diperoleh lima kandidat primer. Lima kandidat primer tersebut di uji kembali dengan software AmplifX dan dipilih satu pasang primer yang sesuai dengan kriteria primer spesifik. Primer yang digunakan dalam amplifikasi sekuensi gen *cfl* yaitu primer PSG_ *cfl*2-F dengan sekuensi 5' TTCCTACGGTACGACGGAGTCT 3' dan PSG_ *cfl*2-R dengan sekuensi 3' CCCACTGGTAGTACGCAACAGA 5'. Hasil amplifikasi sekuensi gen *cfl*

terhadap *P. syringae* pv. *glycinea* dengan menggunakan primer PSG_cfl2 adalah negatif, hal ini ditunjukkan dengan ketidakhadiran pita DNA pada gel elektroforesis. Ketidakhadiran pita DNA hasil amplifikasi gen *cfl* kemungkinan disebabkan karena bakteri target tidak memiliki gen *cfl*. Hal ini sesuai dengan temuan yang menyatakan bahwa tidak semua *P. syringae* pv. *glycinea* memiliki gen *cfl*. Untuk membuktikan ketiadaan gen *cfl* pada *P. syringae* pv. *glycinea* maka dilakukan uji pendekatan induksi hipertropi pada jaringan kentang. Pengujian tersebut juga memberikan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya hipertropi pada jaringan kentang yang ditetesi dengan suspensi *P. syringae* pv. *glycinea*. Berdasarkan pada nekrosis yang lemah pada uji virulensi dan patogenitas, tidak terbentuknya hipertropi pada jaringan kentang dan tidak adanya pita gen *cfl* pada elektroforesis produk PCR disimpulkan bahwa *P. syringae* pv. *glycinea* tidak memiliki gen *cfl*.

4. Transformasi Genetika

Transformasi genetik merupakan suatu perpindahan (*transfer*) gen asing yang diisolasi dari tanaman, virus, bakteri atau hewan ke dalam suatu genom baru

(*new genetic background*) (Webb dan Morris, 1992). Beberapa teknik transformasi yang dikenal adalah elektroforesis, *gene-gun* dan mempergunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*.

Penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.) merupakan salah satu hama penting kedelai dan masih sulit dikendalikan secara konvensional. Penggunaan varietas tahan merupakan strategi terbaik dan relatif aman, namun hingga saat ini sumber gen ketahanan tersebut belum ditemukan pada plasma nutfah kedelai yang ada. Perakitan tanaman kedelai transgenik tahan penggerek polong merupakan alternatif terbaik untuk mengatasi masalah ini. Metode transfer gen pada tanaman yang paling banyak digunakan adalah dengan perantara vektor *Agrobacterium*. Karena sangat sederhana dan murah, pada prinsipnya gen interest disisipkan ke plasmid T-DNA *Agrobacterium* lalu diinokulasikan ke jaringan target yang telah dilukai. Namun, tidak semua jenis tanaman dapat diinfeksi oleh *Agrobacterium* sehingga aplikasinya terbatas pada beberapa jenis tanaman saja (Hinchee *et al.*, 1988).

Pardal *et al.*, (2004) menyatakan bahwa transfer gen *pinII* pada tanaman kedelai telah berhasil dilakukan melalui *A. tumefaciens* dengan dihasilkannya satu event tanaman AT1 (Tidar) yang menunjukkan hasil PCR positif terhadap gen *pinII*. Protokol terbaik untuk transformasi kedelai melalui *A. tumefaciens* adalah menggunakan eksplan kotiledon muda dengan kerapatan bakteri 1×10^8 sel/ml/ lama inokulasi 90

menit dan lama kokultivasi 5 hari. Tanaman kedelai AT1R1 (Tidar) hasil transformasi melalui *A. tumefaciens* sedikit lebih tahan terhadap hama penggerek polong daripada tanaman kedelai nontransgenik (Kontrol).

Ada pun proses transformasi genetika pada tanaman kedelai dengan perantara bakteri *A. tumefaciens* secara rinci disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Persentase gus positif pada eksplan embrio dan kotiledon muda kedelai Wilis hasil transformasi dengan *A. Tumefaciens*

Jenis eksplan/ Kerapatanbakteri	Jumlah eksplan	Lama inokulasi 60 menit Inoculation time (60 min)		Lama inokulasi 90 menit Inoculation time (90 min)	
		3 hari kokultivasi	5 hari kokultivasi	3 hari kokultivasi	5 hari kokultivasi
Explan type/ (OD ₆₀₀)	Explant				
Embriomuda					
0.5	6	2 (33.3)	2 (33.3)	1 (16.7)	1 (16.7)
1	6	3 (50)	4 (66.7)	4 (66.7)	5 (83.3)
1.5	6	0 (0)	1 (16.7)	3 (50)	1 (16.7)

Keterangan : OD₆₀₀ = 1 setaradengan 1x10⁸ sel/ml. Angkadalamkurungadalahpersentase.

Tabel 2, menunjukkan bahwa eksplan embrio dan kotiledon muda kedelai sangat responsive terhadap infeksi *A. tumefaciens*.

Sementara hasil transfer gen *pinII* pada eksplan kedelai melalui *A. tumefaciens* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil regenerasi dan seleksi tanaman dari eksplan kotiledon muda kedelai Wilis dan Tidar yang diinokulasi dengan *A. tumefaciens* yang mengandung gen *pinII*.

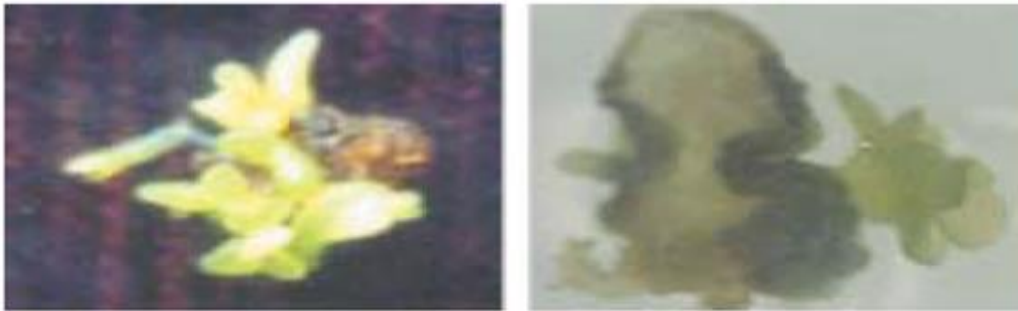
Varietas varieties	Jumlaheksplan Explant number	Jumlahembrio somatik Somatic embryo number	Jumlahplantet Plantet number	Jumlahtanaman Plant number	Kodetanaman Plant Code
Wilistransformasi	1.539	17	15	8	AW1-4
Wilisnontransformasi		1.1	0.9	0.5	
+ kanamisin 200 mg/l	30	1	1	0	
Wilisnontransformasi		3.3	3.3	0	
+ tanpakanamisin	30	16	9	4	AW1-4
Tidartransformasi	984	53.3	30	13.3	
		21	3	1	AT1
		2.1	0.3	0.1	
Tidartransformasi	30	0	0	0	
kanamisin 200 mg/l		0	0	0	
Tidartransformasi	30	24	16	6	AT1-6
tanpakanamisin		80	53.3	20	

Tabel 3, menunjukkan bahwa varietas Wilis memberikan jumlah planlet dan tanaman yang lebih banyak (8 tanaman) dari pada Tidar yang hanya menghasilkan 1 tanaman. Hal ini disebabkan embrio somatik yang dihasilkan dari eksplan Wilis berukuran lebih besar dan bentuknya lebih sempurna sehingga mudah dikecambahkan menjadi planlet/tanaman (Gambar 2). Embrio dari

eksplan Tidar, walaupun jumlahnya lebih banyak daripada Wilis, tetapi ukurannya lebih kecil dan kurang sempurna sehingga banyak yang gagal berkecambah dan akhirnya hanya diperoleh satu tanaman saja (Gambar 4). Tanaman hasil regenerasi berhasil diaklimatisasikan dan tumbuh normal di rumah kaca serta menghasilkan polong yang berbiji (fertil).



Gambar 4 Hasil uji GUS pada eksplan kedelai hasil transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* tampak bercak biru pada eksplan embrio (kiri) dan kotiledon muda (kanan)

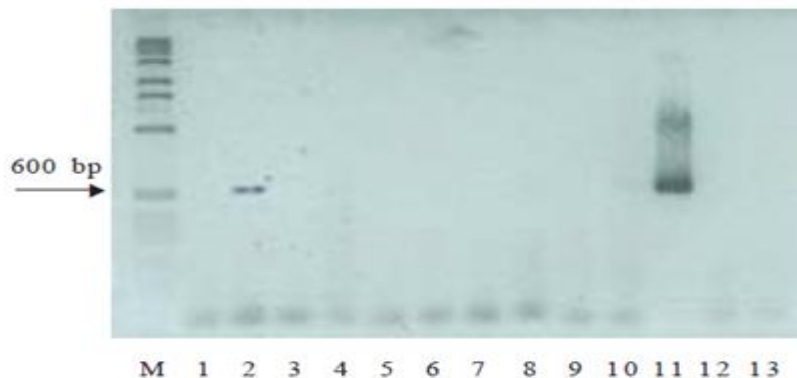


Gambar 5 Pertumbuhan embrio somatic dan eksplan kotiledon muda kedelai varietas Wilis (kiri) dan Tidar (kanan) hasil transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada media seleksi yang mengandung kanamisin 200 mg/l



Gambar 6 Perkecambahan embrio somatic dan aklimatisasi tanaman kedelai Tidar (AT_1) hasil transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*; a = planlet, b = aklimatisasi dalam pot, c = tanaman AT_1 di rumah kaca

Analisis molekuler tanaman kedelai hasil transformasi disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7 Hasil PCR sampel DNA tanaman kedelai R_0 hasil transformasi dengan gen *pinII* melalui *Agrobacterium tumefaciens*; M = 1 kb, 1 = air, 2 = AT_1 , 3-10 = $AW_1 - AW_8$, 11 = gen *pinII*, 12 = Tidar non-transformasi, 13 = Wilis non-transformasi.

Hasil analisis molekuler menunjukkan bahwa hanya satu sampel tanaman yang menghasilkan pita sebesar 600 bp (positif), yaitu AT 1 (Tidar), sehingga tanaman ini kemungkinan besar mengandung gen *pinII*. Delapan sampel tanaman Wilis (AW1-AW8) tidak satu pun menghasilkan pita 600 bp (negatif), sehingga tanaman tersebut kemungkinan besar tidak mengandung gen *pinII*.

Herman *et al.*, (2001) telah melakukan pengujian bioasai tanaman kedelai hasil transformasi terhadap larva *E. zinckenella* Treit. Beberapa individu yang diuji (khususnya WP1 dan AT1) memiliki ketahanan terhadap hama ini yang ditunjukkan dengan rendahnya tingkat kerusakan pada polong/biji. Biji yang sehat selanjutnya dikoleksi untuk pengujian lebih lanjut. Pada kegiatan analisis molekuler, telah berhasil diisolasi DNA total dari semua individu R1 pada semua *event* menggunakan sampel daun muda dengan metode modifikasi *Saghai-Marooif* (CTAB). DNA sampel yang telah dimurnikan selanjutnya digunakan untuk deteksi gen *pinII* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik untuk gen *pinII*. Hasil *check* PCR menunjukkan adanya beberapa sampel positif gen *pinII*, yaitu

pada pita berukuran 600 bp, di antaranya AT1-7, AT1-11, AT1-21, AT1-22, AT1-25, dan WP2. Benih tanaman yang PCR positif akan diteruskan untuk analisis generasi berikutnya.

KESIMPULAN

1. Rekayasa genetika alternatif dalam meningkatkan kualitas tanaman kedelai dengan mengubah, memodifikasi susunan gen dengan material baru kedalam tanaman kedelai.
2. Rekayasa genetika pada tanaman kedelaimencakup : Ekstraksi DNA, Kloning gen, Desain gen, Transformasi genetika dan Pemuliaan tanamandi lapangan.
3. Ttransfer gen *pinII* pada tanaman kedelai telah berhasil dilakukan melalui *A. tumefaciens* dengan dihasilkannya satu *event* tanaman AT1 (Tidar) yang menunjukkan hasil PCR positif terhadap gen *pinII*.
4. Protokol terbaik untuk transformasi kedelai melalui *A. tumefaciens* adalah menggunakan eksplan kotiledon muda dengan kerapatan bakteri 1×10^8 sel/ml/ lama inokulasi 90 menit dan lama kokultivasi 5 hari.

5. Tanaman kedelai AT1R1 (Tidar) hasil transformasi melalui *A. tumefaciens* sedikit lebih tahan terhadap hama penggerek polong daripada tanaman kedelai nontransgenik (Kontrol).

R1 Hasil Transformasi dengan Gen *Proteinase Inhibitor II*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. 10 - 18.

Hinchee, M.A.W. D.V. Connor Ward. C.A. Newell. R.E. Mc Donnel. S.J. Sato. C.S. Gasser. D.A. Fischhoff. D.B. Re. R.T. Fraley and R.B. Horsch. 1988. Production of Transgenic Soybean Plants Using *Agrobacterium Mediated DNA Transfer*. *Bio. Tech.* (6) : 915 - 922.

Karmana I.W. 2009. Adopsi Tanaman Transgenik dan Beberapa Aspek Perkembangannya. *GaneC Swara.* (3) (2) : 12 - 21.

Listanto, E., S.J. Pardal, and Kan Wang. 1996. A Simple Method of DNA Isolation From Transgenic Maize Plant for Polymerase Chain Reaction. *Indonesian Journal of Agricultural Biotechnology.* (1) (1) : 33 - 38.

Manuhara S.W. 2006. Pengembangan Metode Transformasi Genetik Tanaman Untuk Meningkatkan Kesejahteraan Hidup Manusia. Seminar Nasional Biodiversitas. UNAIR Surabaya. 1 – 11.

McGarvey, P. and J.M. Kaper. 1991. A Simple and Rapid Method for Screening Transgenic Plants Using the PCR. *Biotechniques.* (11) (4) : 428 - 432.

Pardal SJ. G.A. Wattimena. A. Hajrial. M. Herman. L. Edy dan Slamet. 2004. Transfer gen *proteinase inhibitor II* pada Kedelai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk Ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella* Tr.). *Jurnal Bioteknologi Pertanian.* (9) (1) : 20 - 28.

DAFTAR PUSTAKA

Astuti R.I. M. Dewi dan F. Sarah Asih. 2002. Kloning Fragmen DNA Genom Yang Terlibat Dalam Toleransi Asam Aluminium Pada *Bradyrhizobium Japonicum*. Available at : <http://www.directory.umm.ac.id>. 1 - 8.

Dawson MT, Powell R, Gannon F. 1996. *Gene Technology*. Graham JM, Billington D, Gilmartin PM, editor. Oxford: BIOS Scientific Publ. Ltd. 91 - 95.

Fernandes, K.V.S. and J.X. Filho. 1993. Plant Molecular Biology and Genetic Engineering: Prospects for The Brazilian Northeast. *R. Bras. Fisiol. Veg.* (5) (2) : 187 - 191.

Hadiarto T. U. Tri Indraini R. P. Saptowo J dan M. Herman. 2002. Analisis Molekuler Gen *pinII* pada Tanaman Kedelai Transgenik R2. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. 133 - 140.

Harsono A. 2008. Strategi Pencapaian Swasembada Kedelai melalui Perluasan Areal Tanam di Lahan Kering Masam. *Iptek Tanaman Pangan* Vol. 3 No. 2 : 224-257.

Herman M. S.J. Pardal. E. Listanto. T.I.R. Utami dan D. Damayanti. 2001. Evaluasi Tanaman Kedelai Generasi

- Seraj, Z. I. 2001. The Exciting Future of Biotechnology. Daily Star, Edisi Selasa, 30 Januari 2001.
- Sudaryanto, T. dan D.K.S. Swastika. 2007. Kedudukan Indonesia dalam perdagangan internasional kedelai. p. 28 - 44. *Dalam: Sumarno et al. (Eds.). Kedelai: teknik produksi dan pengembangan.* Puslitbang Tanaman Pangan. Bogor.
- Suryanegara I.W. 2011. OptimismedanPesimismeRekayasaGenetika. Available at :
- Susilawati R. 2013. Desain Primer Spesifik untuk Mengaplikasi Sekuensi Gen *Cfl* (*Coronafacate Ligase*) pada Patogen Hawar Bakteri yang Menginfeksi Kedelai. Skripsi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Webb, K.J. and Morris, P. (1992) Methodologies of Plant Transformation, In: Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A. and Boulter, D. (ed). *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection.* C A B International. United Kingdom/
- Yutono.1985. Inokulasi *Rhizobium* pada kedelai . Di dalam: Somaatmadja *et al.* (editor). *Kedelai.* Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor: Puslitbangtan
- Yuwono T. 2012. Bioteknologi Pertanian. Gadjah Mada University Press. Cetakan Ketiga. 1 - 284.