

## PERBEDAAN POLA POLIPEPTIDA ANTARA LINI KALUS PADI KULTIVAR SEI LILIN YANG TOLERAN DENGAN NON-TOLERAN TERHADAP CEKAMAN ALUMINIUM

Juswardi  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

### ABSTRAK

Perbedaan inter-spesifik antara tanaman toleran dan non-toleran cekaman aluminium dapat dijadikan petunjuk untuk pemuliaan tanaman. Salah satu metoda yang dapat dilakukan adalah seleksi lini kalus pada medium seleksi untuk mendapatkan toleransi. Kemudian pengujian toleransi dapat dilakukan pada kalus sebelum membentuk tanaman utuh, diantaranya mendeteksi pola polipeptida pada lini kalus. Pada penelitian ini untuk mendapatkan lini kalus toleran cekaman Al dilakukan dengan penambahan 0,25 - 1,0 mM Al-etilendiamin tetraasetat (Al-EDTA) ke dalam medium seleksi lini kalus secara bertahap. Sedangkan untuk lini kalus non-toleran Al subkultur dilakukan pada medium induksi kalus. Penentuan pola polipeptida dilakukan dengan elektroforesis gel poliakrilamida sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) 12%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pola polipeptida lini kalus toleran Al secara umum lebih seragam bila dibandingkan dengan pola polipeptida lini kalus non toleran (kontrol, K). Perbedaan pola polipeptida lini kalus toleran Al dengan lini kalus non-toleran yang nyata terdeteksi pada berat molekul (BM) 46 kD, 50 kD dan 60 kD. Namun pola polipeptida 50 kD perubahannya hanya terdeteksi pada lini kalus non-toleran saja.

### PENDAHULUAN

Dalam pengembangan lahan untuk memenuhi kebutuhan pangan khususnya di Sumatera Selatan menghadapi kendala, dari 2.250.000 ha lahan yang potensi dimanfaatkan adalah lahan pasang surut, rawa dan lebak. Lahan ini merupakan lahan masam yang mempunyai aluminium (Al) terlarut yang tinggi. Aluminium

yang terdapat dalam lahan masam tersebut merupakan cekaman bagi tanaman Basu *et al.* (1994) dan Rengel dan Elliot (1992) menyatakan bahwa Al terlarut dalam lahan masam merupakan salah satu faktor pembatas utama produksi pertanian penting.

Cekaman Al pada konsentrasi tertentu dapat menyebabkan modifikasi pertumbuhan pada tingkat organ, jaringan dan sel (Basu *et al.* 1994; Kochin, 1995). Lebih lanjut dijelaskan bahwa cekaman Al pada tumbuhan dapat menyebabkan gangguan struktur dan fungsi membran, gangguan sintesis DNA dan mitosis. Selain itu cekaman Al juga dapat menurunkan respirasi, mengganggu enzim tertentu, meningkatkan kekakuan dinding sel, mengganggu penyerapan dan penggunaan beberapa unsur seperti, kalsium, fosfor, magnesium dan kalium serta senyawa amonium, nitrat dan air. (Basu *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1996; Nichol *et al.*, 1993; Tice *et al.*, 1992; Widell *et al.*, 1994)

Mekanisme toleransi terhadap cekaman Al secara fisiologi dapat berbeda antar spesies atau varitas dan genotip tanaman yang berbeda. Perbedaan inter-spesifik dalam toleransi terhadap Al dapat digunakan sebagai petunjuk bagi pemulia tanaman dalam mendapatkan tanaman yang toleran terhadap Al. Selanjutnya dijelaskan bahwa tanaman yang toleran Al harus mampu mencegah penyerapan Al yang berlebihan atau mampu mendetoksifikasikan Al tersebut setelah diserap (Ryan *et al.*, 1992; Tice *et al.*, 1992).

Basu *et al.* (1994) menjelaskan bahwa mekanisme toleransi internal dari tumbuhan terhadap Al diantaranya, tumbuhan dapat menginduksi sintesis protein, sintesis enzim atau isozim yang bertanggung jawab dalam sifat toleransi dan juga dapat menginduksi sintesis protein spesifik pengelat Al. Lebih lanjut dinyatakan bahwa tanaman akan menginduksi protein spesifik (protein kejut bahang) bila ada cekaman lingkungan, yang selanjutnya berguna sebagai adaptasi fisiologi terhadap cekaman lingkungan.

Suatu hal yang penting mengenai mekanisme toleransi tanaman terhadap logam-logam berat adalah didetoksifikasinya logam-logam tersebut oleh fitokelatin. Fitokelatin merupakan asam amino sistein yang terdiri dari peptida-peptida kecil yang mengandung banyak sulfat. Fitokelatin ini dihasilkan oleh sejumlah spesies tanaman, tetapi sejauh ini hanya ditemukan bila terdapat sejumlah logam berat (Gokeler *et al.*, 1989; Rauser, 1990; Steffens, 1990 dalam Salisbury dan Ross, 1992). Berdasarkan fungsinya fitokelatin tersebut dapat termasuk ke dalam protein kejut bahang karena cekaman logam berat.

Perbaikan sifat tanaman padi yang toleran terhadap cekaman lingkungan yang merugikan dapat dilakukan dengan kultur *in vitro* melalui seleksi dari variasi somaklonal yang dihasilkan. Seleksi kalus selama subkultur akan menghasilkan lini kalus toleran terhadap cekaman, yang selanjutnya bila diregenerasikan baik melalui embriogenesis dan organogenesis akan menghasilkan somaklon yang mampu beradaptasi pada cekaman tersebut. Selain itu teknik ini juga mempunyai kegunaan dalam penelitian fisiologi, biosel, genetika dan biokimia. Pengujian yang sederhana dapat dilakukan pada kalus untuk mengidentifikasi variabilitas sebelum terbentuk tanaman. Pengujian menggunakan kalus lebih menguntungkan dibandingkan menggunakan tanaman utuh, karena pengujian pada tanaman utuh membutuhkan waktu evaluasi yang singkat.

Diperkirakan pada lini kalus padi kultivar Sei Lilin yang toleran dan non-toleran Al akan terdapat perbedaan pola polipeptidanya yang merupakan respons adaptasi terhadap cekaman Al tersebut.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat perbedaan pola polipeptida antara lini kalus padi kultivar Sei Lilin yang toleran dan non-toleran cekaman Al.

## **BAHAN DAN METODA**

### **2.1. Bahan Penelitian**

Padi (*Oryza sativa* L.) yang digunakan adalah kultivar Sei Lilin dan didapat dari Balai Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan Sukamandi, Jawa Barat.

### **2.2. Induksi dan seleksi kalus**

Komposisi medium yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah medium dasar MS yang dimodifikasi dengan zat pengatur tumbuh  $10^{-5}$  M 2,4-D (asam 2,4-diklorofenoksiasetat). Lini kalus padi yang toleran Al didapatkan dari seleksi kalus yang disubkultur secara bertahap pada medium cekaman Al mulai dari 0,25 - 1,00 mM. Sedangkan untuk lini kalus non-toleran Al hanya disubkultur pada medium MS.

### **2.3. Ekstraksi protein**

Ekstraksi protein dilakukan mengikuti metoda yang dimodifikasi. Sebanyak 200 mg berat basah kalus digerus dalam nitrogen cair. Kemudian dihomogenisasi dalam 2,0 ml dapar

Tris-HCl, pH 8,0 yang ditambah 0,15% Triton-X100 pada suhu 0°C. Homogenat yang didapatkan disentrifugasi pada kecepatan 14.000 g suhu 0°C selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi ditambah dengan 10% gliserol dan disimpan dalam Eppendorf suhu 0 - 4°C.

#### **2.4. Penentuan kadar protein total**

Penentuan kadar protein total dilakukan dengan menggunakan 20% reagen "coomassie brilliant blue G<sub>250</sub> dari Bio-rad, untuk 10 - 200 µg protein ekstrak. Sebagai protein standar digunakan "bovine serum albumin, BSA" dari Bio-rad. Penentuan kadar protein total dilakukan pada panjang gelombang 595 nm, berdasarkan metoda Bradford (1976).

#### **2.5. Elektroforesis dan penentuan polipeptida**

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan alat elektroforesis "Mini Protean-II Cell" dan gel poliakrilamida-sodium dodesilsulfat (SDS-PAGE) 12% sistem dapar Laemmli (1970). Berat molekul (BM) polipeptida ditentukan berdasarkan polipeptida standar yang memiliki BM 14,5 - 200 kD dari Bio-rad. Pemisahan dilakukan pada tegangan konstan 120 volt, suhu 4°C. Selanjutnya polipeptida diwarnai dengan reagen "coomassie brilliant blue R<sub>250</sub>."

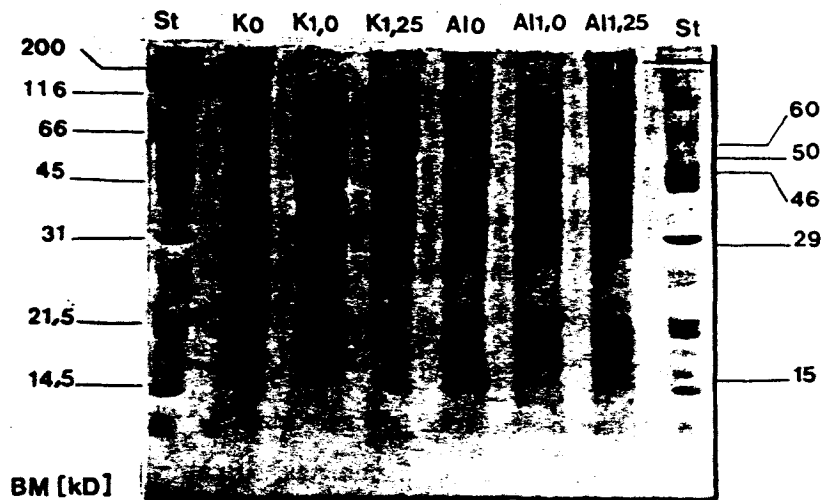
#### **2.6. Analisis data berat molekul polipeptida**

Berat molekul polipeptida ditentukan dengan menghitung pergerakan relatifnya mengikuti metoda Weber dan Osborn dalam See dan Jackowski, 1990 yang dimodifikasi. Berat molekul polipeptida yang belum diketahui dinterpolasikan dengan menggunakan kurva standar dari polipeptida standar dan hasilnya ditransformasi logaritmik.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil penelitian tentang perbedaan pola polipeptida lini kalus padi kultivar Sei Lilin toleran dan non-toleran cekaman Al yang dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamida-sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) 12%, didapatkan sebagai berikut :

Perubahan pola polipeptida antara lini kalus toleran (Al) dan lini kalus non-toleran (kontrol, K) padi kultivar Sei Lilin, secara umum terlihat bahwa pola polipeptida lini kalus toleran Al lebih seragam dibandingkan lini kalus non-toleran (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Pola polipeptida lini kalus padi kultivar Sei Lilin lini kalus non-toleran (kontrol, K<sub>0</sub>, K<sub>1,0</sub>, K<sub>1,25</sub>) dan lini kalus toleran Al (Al<sub>0</sub>, Al<sub>1,0</sub>, Al<sub>1,25</sub>) serta polipeptida standar (St).

Lebih seragamnya perubahan pola polipeptida lini kalus toleran Al disebabkan karena selamasubkultur terjadi seleksi pada medium yang ditambah Al dengan kisaran konsentrasi 0,25 mM setiap kali subkultur. Sedangkan lini kalus non-toleran Al tidak dilakukan seleksi

yang hanya disubkultur pada medium tanpa penambahan Al, tetapi pada pengujian toleransi lini kalus langsung diperlakukan dengan 1,0 dan 1,25 mM Al, sehingga terjadi cekaman.

Perubahan pola polipeptida secara umum tersebut menunjukkan bahwa terjadi perubahan yang stabil pada lini kalus toleran Al. Stabilitasnya perubahan pola polipeptida lini kalus toleran Al disebabkan karena kalus tersebut sudah terhabituasi oleh cekaman Al sehingga mempertahankan sifat adaptasi yang stabil terhadap Al. Lydia (1988) menjelaskan, bahwa persentase tumbuh lini sel kedelai kultivar Orba dan Lokon yang diseleksi terhadap Al, setelah diuji sifat toleransinya terhadap Al ternyata memperlihatkan hasil yang tidak berbeda. Hal yang berlawanan terjadi pada lini sel kontrol yaitu terjadi perbedaan persentase tumbuh. Hasil tersebut dapat menunjukkan, bahwa lini sel kedelai kultivar Orba dan Lokon hasil seleksi mempunyai toleransi yang stabil terhadap Al.

Gambar 3.1 terlihat pola polipeptida lini kalus padi kultivar Sei Lilin toleran cekaman aluminium berbeda dengan lini kalus non-toleran. Perbedaan yang nyata terlihat pada polipeptida 46, 50 dan 60 kD.

Perbedaan kualitas pola polipeptida yang nyata terjadi pada lini kalus toleran Al adalah polipeptida dengan berat molekul (BM) 46 dan 60 kD bila dibandingkan dengan lini kalus non-toleran. Polipeptida 46 dan 60 kD ini terdeteksi lebih jelas pada lini kalus toleran Al dibandingkan dengan lini kalus non-toleran. Sedangkan antar sesama lini kalus toleran (Al<sub>0</sub>, Al<sub>1,0</sub>, Al<sub>1,25</sub>) polipeptida 46 dan 60 kD tersebut terdeteksi dengan kualitas yang hampir sama. Tetapi pada lini kalus non-toleran terdeteksi dengan kualitas yang berbeda. Hasil ini menunjukkan bahwa lini kalus toleran Al sudah mempunyai sifat toleransi yang stabil terhadap cekaman Al.

Pada lini kalus non-toleran pita polipeptida 50 kD ini terlihat makin bertambah kualitasnya yang terdeteksi jika makin bertambah konsentrasi perlakuan Al (K<sub>0</sub>, K<sub>1,0</sub>, K<sub>1,25</sub>). Tetapi pola polipeptida 50 kD ini pada lini kalus toleran Al maka akan terlihat perubahannya lebih seragam dan terdeteksi dengan kualitas yang hampir sama atau lebih rendah jika dibandingkan dengan lini kalus non-toleran. Dari hasil tersebut diduga bahwa polipeptida 50 kD ini kemungkinan merupakan polipeptida yang terakumulasi sebagai respons toleransi kalus akibat cekaman Al. Basu *et al.* (1994) melihat perbedaan protein membran mikrosom dari dua kultivar gandum yang mempunyai kepekaan yang berbeda terhadap cekaman Al. Hasil analisis protein dengan "SDS-PAGE" menunjukkan perubahan pola-pola polipeptida sebagai respons akibat cekaman Al.

Lebih lanjut dijelaskan bahwa polipeptida dengan BM 51 kD menunjukkan akumulasi yang berbeda pada kultivar-471 bila diperlakukan dengan Al dan tanpa Al. Sedangkan kultivar Neewapa yang toleran terhadap Al tidak terlihat perbedaan, baik pada perlakuan Al maupun tanpa Al. Polipeptida ini diduga merupakan protein spesifik yang berhubungan dengan toleransi kultivar terhadap cekaman Al.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian tentang perbedaan pola polipeptida lini kalus padi kultivar Sei lilin toleran dan non-toleran, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pola polipeptida lini kalus toleran Al lebih seragam dari lini kalus non toleran Al (lini kalus kontrol, K).
2. Perbedaan pola polipeptida antara lini kalus toleran dan non-toleran terdeteksi pada berat molekul 46, 50 dan 60 kD.
3. Polipeptida 46 dan 50 kD berbeda hanya antara lini kalus toleran dan non-toleran Al sedangkan sesamanya tidak berbeda, tetapi polipeptida 50 kD perubahan hanya terlihat antar lini kalus non-toleran Al saja.

## DAFTAR PUSTAKA

- Basu, A., U. Basu dan G.J. Taylor. 1994. Induction of microsomal membrane protein in roots of an aluminum - resistant of *Triticum aestivum* L. under condition of aluminum stress. Plant Physiol. 104 : 1007 - 1013
- Kochian. L. V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46 : 237 - 260.

- 
- Matsumoto, H., Y. Senoo, M. Kasai dan M. Maeshima. 1996. Responce of the plant root to aluminum stress : Analysis of inhibition of the root elongation and changes in membrane function. J. Plant Res. 109 : 99 - 105
- Nichol B.E., L.A. Oleveire, A.D.M Glass dan M.Y. Siddiqi. 1993. The effect of aluminum on the influx calsiium., potasium, amonium, nitrat and phospate in aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare L.*). Plant Physiol. 103 : 1262 - 1266.
- Ryan, P.R., J.E. Shaff dan L.V Khocian. 1992. Aluminum toxicity in roots correlation among ionic current, ion fluxes, and root alongation in aluminum-sensitive and aluminum - sensitive-tolerant wheat cultivars. Plat Physiol. 99: 1192 - 1200.
- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1992. Plant Physiology. 4<sup>th</sup> Ed. California. Hal 126.
- See.Y.P dan G. Jackowski. 1990. Estimating molecular weights of polipeptide by SDS gel electrophoresis. Dalam : Protein Structure a Partical Approach. Ed. Creihton, T.E. OIRL. Press Oxford Univresity Press. Oxfröd. Hal 10.