

PAIR/P.602/94

ELEKTROPORESIS ISOENZIM UNTUK IDENTIFI-
KASI BEBERAPA GALUR MUTAN KACANG TANAH
(*Arachis hypogerae* L).

Ermin K, Winarno, Aryanti, Firdaus
dan Kumala Dewi

ELEKTROFORESIS ISOENZIM UNTUK IDENTIFIKASI BEBERAPA GALUR MUTAN KACANG TANAH (*Arachis hypogaeae* L.)

Ermin K. Winarno*, Aryanti*, Firdaus* dan Kumala Dewi*

ABSTRAK

ELEKTROFORESIS ISOENZIM UNTUK IDENTIFIKASI BEBERAPA GALUR MUTAN KACANG TANAH (*Arachis hypogaeae* L.). Telah dilakukan studi genetik terhadap isoenzim esterase, peroksidase, fosfatase asam, alkohol dehidrogenase dan enzim malat dari beberapa galur mutan kacang tanah. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi genetik dari galur mutan kacang tanah hasil iradiasi gamma terhadap kacang tanah varietas Kidang, yaitu K20, K25 dan K30, selain itu terhadap varietas Pelanduk, yaitu P20, P25 dan P30. Ekstrak enzim diambil dari kotiledon, daun, bunga dan biji kacang tanah, kemudian difraksinasi secara elektroforesis disk-gel poliakrilamid. Dari pewarnaan isoenzim peroksidase kotiledon, daun dan bunga, serta fosfatase asam kotiledon kacang tanah diperoleh pola isoenzim yang menunjukkan adanya perbedaan antara hasil iradiasi dengan kontrol. Dari zimogram lainnya seperti esterase, fosfatase asam, alkohol dehidrogenase dan enzim malat tidak terlihat adanya perbedaan yang menyolok antar tanaman, namun telah terjadi pergeseran jarak migrasi rangkaian polipeptida proteinnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setiap galur mutan kacang tanah disusun oleh gen yang berbeda karena mutasi. Galur-galur mutan tersebut walaupun secara morfologik sulit dibedakan satu dengan yang lain, tetapi secara genetik berbeda.

ABSTRACT

ELECTROPHORETIC OF ISOENZYMES FOR IDENTIFICATION OF SEVERAL PEANUT MUTANT LINES (*Arachis hypogaeae* L.). Genetics study on several mutant lines of peanut has been carried out based on isoenzymes changes of esterase, peroxidase, acid phosphatase, alcohol dehidrogenase and malic enzymes. The aim of this study was to get a genetic information of several peanut mutant lines by gamma irradiation on peanut Kidang variety and its three mutant

* Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN

lines : K20, K25 and K30, also on peanut Pelanduk variety and three mutan lines : P20, P25 and P30. The enzyme extracts were taken from peanut cotyledones, leave flowers, and raw seeds, then fractionated using polyacrylamide-disc gel electrophoresis technique. From staining of peroxidase of peanut cotyledone, leave and flower, also acid phosphatase of peanut cotyledone were obtained the isoenzyme pattern which showed the existance of genetic difference between mutant lines with the control. From the other zymogrames such as esterase, acid phosphatase, alcohol dehydrogenase and malic enzymes did not show the existense of genetic difference among peanut plants, but there were the changes in migration polypeptide chains of the proteins. The result of this study showed that due to mutation each of peanut mutant lines is consisted of the different gen. Although it is difficult to differentiate among the mutant lines each other morphologically, but it is different genetically.

PENDAHULUAN

Sejak tahun 1991 Kelompok Pemuliaan Tanaman di PAIR-BATAN telah memulai penelitian untuk mendapatkan tanaman kacang tanah dengan sifat dan hasil yang unggul melalui radiasi. Radiasi gamma merupakan salah satu cara untuk mendapatkan tanaman dengan sifat unggul seperti umur pendek produksi tinggi atau tahan terhadap penyakit (1). Dari hasil penelitian sebelumnya ternyata radiasi sampai dengan dosis 30 krad belum berpengaruh terhadap keragaman jumlah polong dan biji serta berat 100 biji kacang tanah varietas Kelinci, tetapi pada dosis 20 dan 25 krad terjadi pergeseran pola pembentukan polong ke arah yang lebih tinggi (1).

Untuk mengidentifikasi perbedaan gen pada peristiwa mutasi pada jaringan tumbuhan dapat dilihat dari susunan asam amino, peptida, polipeptida protein atau enzim yang dihasilkan secara terus menerus (2). Salah satu teknik yang telah banyak digunakan, yaitu teknik elektroforesis untuk penyidikan protein atau isoenzim berbagai enzim yang turut aktif dalam metabolisme, antara lain esterase, peroksidase dan beberapa isoenzim yang lain (3,4).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi genetik dari beberapa galur mutan harapan sebagai hasil iradiasi gamma terhadap kacang tanah varietas Kidang dan Pelanduk. Perubahan gen yang terjadi akibat mutasi diharapkan dapat dilacak dan dipelajari melalui produk langsung gen berupa protein atau enzim dengan menggunakan teknik elektroforesis disk gel poliakrilamid (4).

BAHAN DAN METODE

Bahan Percobaan. Bagian dari tanaman kacang tanah yang diambil untuk selanjutnya diekstrak, yaitu kotiledon (3-10 hari), daun (14-17 hari), bunga (30-40 hari) dan biji mentah (63-77 hari). Tanaman kacang tanah varietas Kidang dan tiga galur mutannya (K20, K25 dan K30), serta varietas Pelanduk dan tiga galur mutannya (P20, P25 dan P30) ditanam pada petak berukuran 3 m x 1,5 m dengan jarak tanaman 20 cm x 20 cm dengan biji perlubang. Galur mutan tersebut merupakan hasil Kelompok Pemuliaan Tanaman PAIR - BATAN melalui perlakuan iradiasi gamma terhadap varietas asalnya. K20 atau P20 artinya kacang tanah varietas Kidang atau Pelanduk yang diradiasi dengan dosis 20 krad, .lh8 demikian seterusnya.

Bahan Kimia. Bahan kimia akrilamid ; N,N'- metilen-bisakrilamid ; N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) yang berkualitas 'electran', β -nikotinamidadenin dinukleotida (β -NAD), 'Nitro Blue Tetrazolium' (NBT) dan 'Phenazine Methosulphate' (PMS), garam 'Fast blue RR' dan 'Fast Garnet GBC' berkualitas 'Gurr', semuanya diperoleh dari BDH. Bahan kimia lainnya, yaitu 3-amino-9-etil- karbazol, α -naftil asetat, β -naftil asetat diperoleh dari Merck, sedangkan β -nikotinamid adenin dinukleotida fosfat .lh8 (β -NADP) diperoleh dari Sigma.

Pembuatan Ekstrak Enzim. Bahan percobaan berupa kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah masing-masing seberat 3 gram digerus dengan 3 ml air suling dingin. Homogenat disaring dengan kain lalu disentrifuga dengan kecepatan 2000 putaran per menit selama 1 jam. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk elektroforesis .lh8 sebanyak 100 μ l, untuk setiap gel.

Elektroforesis. Elektroforesis-disk gel poliakrilamid (EDGP) dilakukan sesuai dengan metode DAVIS (5), menggunakan bufer tris-glisin pH 8,3 sebagai larutan elektrolit. Fraksinasi dilakukan pada konsentrasi gel poliakrilamid 7,5 %, dalam tabung yang panjangnya 75 mm dan diameter 5 mm, kuat arus yang digunakan sebesar 2 mA/gel pada suhu 5 - 10°C selama 30 menit dan dilanjutkan .lh8 3 mA/gel selama 60 menit.

Pewarnaan Isoenzim. Pewarnaan dilakukan sesuai dengan metode GLASZMANN (3). Enzim esterase (EST) diaktifkan dengan larutan pewarna yang mengandung substrat α -naftil asetat, β -naftil asetat serta pewarna garam 'Fast blue RR' dalam larutan bufer-fosfat 0,1 M pH 7,0. Isoenzim peroksidase (PER) diwarnai dengan larutan yang mengandung substrat H_2O_2 0,7 % dan pewarna 3-amino-9-etil karbazol. Pewarnaan untuk isoenzim fosfatase asam (FA) menggunakan larutan yang mengandung α -naftil fosfat dan pewarna garam

'Fast Garnet GBC'. Larutan pewarna isoenzim alkohol dehidrogenase (ADH) terdiri dari β -NAD, NBT dan PMS. Selanjutnya isoenzim malat (MAL) diwarnai dengan larutan yang mengandung β -NADP, NBT dan PMS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pola isoenzim esterase dari kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang dan tiga galur mutannya K20, K25 dan K30 serta varietas Pelanduk dan tiga galur mutannya P20, P25 dan P30 dapat dilihat pada Gambar 1.

Tampak bahwa pada kotiledon terdapat 6 pita, daun mempunyai 4 pita, bunga 5 pita dan pada biji terdapat 3-4 pita esterase. Jumlah pita esterase pada setiap galur mutan baik dari induk Kidang maupun Pelanduk ternyata sama dengan induknya, kecuali pada biji galur mutan K20 berkurang 1 pita dan pada biji P20 dan P25 bertambah 1 pita. Pola isoenzim esterase dari kotiledon, daun dan bunga identik antara galur mutan dengan kontrol, namun ada perbedaan pada jarak migrasi pitanya. Pergeseran jarak migrasi dapat disebabkan oleh perubahan muatan dalam susunan polipeptida protein (4). Pada isoenzim esterase biji mentah kacang tanah selain terjadi pergeseran pita, terjadi pula penebalan dan penipisan pita, hal ini menunjukkan bahwa rangkaian polipeptida protein juga mengalami perubahan secara kuantitatif, sebagian menjadi lebih panjang dan sebagian menjadi lebih pendek (4). Hilangnya 1 pita menunjukkan adanya enzim esterase yang tidak lagi diproduksi.

Aktivitas esterase sangat berperan dalam senesensi jaringan tanaman, yaitu dalam proses pematangan yang disertai perlunakan jaringan akibat katabolisme polisakarida dinding sel (6). Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah perubahan gen pembentukan esterase akibat mutasi berhubungan dengan sifat kegenjahan tanaman.

Pada Gambar 2 terlihat bahwa pola isoenzim peroksidase setiap galur mutan berbeda dengan induknya. Jumlah pita pada kotiledon ketiga galur mutan berasal dari varietas Kidang bertambah 4 pita dibandingkan dengan induknya. Pada varietas Pelanduk terdapat 5 pita, P20 kehilangan 2 pita, sedangkan pada P25 dan P30 bertambah 2 pita. Selain jumlah pita bervariasi, intensitas pitapun mengalami perubahan, demikian juga jarak migrasi pita mengalami pergeseran. Pada daun K20 dan K25 muncul 2 pita yang baru, sedangkan jumlah pita peroksidase pada ketiga galur mutan Pelanduk tidak berubah.

Pola peroksidase bunga galur mutan mengalami perubahan, yaitu terbentuk pita baru dan terjadi juga penghilangan pita pada beberapa galur mutan. Selanjutnya pada peroksidase biji terdapat pola yang identik antara galur mutan dan induknya, namun berbeda jumlah dan jarak migrasi pitanya.

Dari pola isoenzim ini dapat dikatakan bahwa galur-galur mutan tersebut mengandung protein-protein yang berbeda, tetapi mempunyai reaksi katalisis yang sama. Pada pola isoenzim peroksidase kotiledon terjadi peningkatan jumlah pita, kemungkinan ini disebabkan terjadinya perubahan gen akibat mutasi yang menyebabkan meningkatnya produksi isoenzim peroksidase. Apakah hal ini berkaitan dengan daya tahan tanaman kacang tanah terhadap penyakit layu perlu dipelajari lebih lanjut. Mengingat pembentukan peroksidase merupakan faktor utama yang menentukan resist-

ensi tanaman terhadap penyakit (7).

Menurut Hagemann (7) peroksidase juga berperan dalam proses absisi yaitu hilangnya organ musiman seperti daun, bagian bunga, buah atau cabang. Peroksidase menyebabkan sintesis etilen meningkat selama diferensiasi zona absisi ini, artinya peroksidase menginduksi proses pembungaan sampai pematangan buah (7).

Isoenzim lain yang diamati zimogramnya yaitu fosfatase asam, dapat dilihat pada Gambar 3. Enzim fosfatase asam ini berperan menghidrolisis senyawa organik fosfat. Pola isoenzim fosfatase asam dari kotiledon menunjukkan adanya perbedaan antara galur-galur mutan dan induknya. Pada ketiga galur mutan varietas Kidang jumlah pita mengalami peningkatan, sedang pada ketiga galur mutan varietas Pelanduk kehilangan 1 pita. Pola isoenzim fosfatase asam pada daun dan bunga identik antara masing-masing induk dengan galur mutannya, namun telah terjadi pergeseran jarak migrasi pita. Tampaknya gen pengontrol pembentukan fosfatase asam telah mengalami perubahan akibat mutasi.

Pada Gambar 4 ditunjukkan pola enzim malat kotiledon, daun dan biji mentah kacang tanah. Enzim malat berperan dalam salah satu jalur metabolisme daur Krebs yang merupakan bagian utama metabolisme penghasil energi dan pada proses asimilasi karbondioksida (8). Enzim malat pada kotiledon hanya terdiri dari 1 pita, namun jarak migrasi

dan intensitasnya mengalami perubahan. Pada daun K25 dan K30 terjadi pembentukan 1 pita baru, sementara pada P25 dan P30 terjadi pengurangan 1 pita dari 2 pita pada induknya. Enzim malat pada bunga ~~tidak~~ terdeteksi, artinya pada bunga tidak terdapat enzim malat. Pada biji K30, P25 dan P30 terjadi pengurangan 1 pita dari 2 pita yang dimiliki oleh masing-masing induknya. Aktivitas enzim malat diketahui meningkat pada proses pematangan buah (7).

Terlihat bahwa gen pembentukan enzim malat telah mengalami perubahan akibat mutasi, namun untuk mengetahui kaitannya dengan sifat genjah kacang tanah masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Selain ke empat isoenzim di atas, diamati pula isoenzim alkohol dehidrogenase dari tanaman kacang tanah. Alkohol dehidrogenase ini berperan pada proses respirasi dan metabolisme karbohidrat (8). Pada Gambar 5 terlihat setiap galur mutan mempunyai 1 pita yang identik satu sama lain, baik pada kotiledon maupun biji. Sedikit perbedaannya yaitu pada pergeseran jarak migrasi pita. ini berarti bahwa muatan polipeptida telah mengalami perubahan. Alkohol dehidrogenase pada daun dan bunga tidak terdeteksi, menunjukkan bahwa pada daun dan bunga kacang tanah tidak terdapat pembentukan alkohol dehidrogenase.

Pada ulangan pertama dan kedua, alkohol dehidrogenase dari beberapa galur mutan seperti K20, K25, P20 dan P25 menipis pitanya, kemungkinan telah terjadi perubahan pada

panjang rangkaian polipeptida alkohol dehidrogenase menjadi lebih pendek (4). Setelah mutasi, adanya perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh interaksi faktor lingkungan dan genetik.

Berdasarkan ke lima zimogram dari atas terlihat bahwa pengaruh radiasi paling besar yaitu terhadap gen pengontrol pembentukan peroksidase. Setelah mutasi, keragaman pola pita peroksidase meningkat pada kotiledon, daun dan bunga galur-galur mutan kacang tanah. Hal ini menunjukkan bahwa gen pembentukan esterase, fosfatase asam, enzim malat dan alkohol dehidrogenase relatif stabil terhadap iradiasi gamma. Secara visual perbedaan antara setiap galur mutan dengan induknya tidak dapat dibedakan, namun secara genetik berdasarkan elektroforesis terdapat perbedaan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Gen pengontrol pembentukan isoenzim esterase, peroksidase, fosfatase asam, enzim malat dan alkohol dehidrogenase pada enam galur mutan kacang tanah telah mengalami mutasi akibat iradiasi gamma.

2. Secara genetik galur-galur mutan kacang tanah dapat dibedakan dengan cara elektroforesis, walaupun secara fisiologis tidak berbeda.

3. Gen pengontrol pembentukan isoenzim esterase pada kotiledon, daun dan bunga kacang tanah diduga lebih tahan terhadap iradiasi gamma daripada gen pengontrol pembentukan enzim lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada saudara Parno atas bantuan yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. DEWI, K., DWIMAHYANI, I., dan ISMACHIN, M., "Pengaruh iradiasi gamma terhadap keragaman jumlah polong dan biji tanaman kacang tanah", Risalah Pertemuan Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi dalam Bidang Pertanian, peternakan, dan Biologi, Jakarta, 1992, BATAN, Jakarta (1993) 287.
2. LEHNINGER, A.L., Principles of Biochemistry, Worth Publisher, Inc. New York (1987) 871.
3. GLASZMANN, J.C., de los ROYES, B.G. and KHUSH, G.S., Electrophoresis variation of isoenzymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.)- a key to the identification of 76 alleles at 24 loci, IRRI Research Paper Series 134 (1988) 1.
4. SOFYAN, R., HARANTUNG, E.K. dan ISMACHIN, M., "Analisis isoenzim glutamat-oksaloasetat transaminase untuk penyidikan dua mutan kacang hijau", Pros. Sem. Biol. Das. I, Bogor (1990) 202.
5. CLARK, J.M. and SWITZER, R.L., Experimental Biochemistry, Freeman W.H. and Co., San Fransisco (1977) 43
6. CURTIS, O. and CLARK, D.G., An Introduction to Plant Physiology, Mc-Graw-Hill Book Company, Inc., New York (1950) 469.
7. TRANGGONO dan SUTARDI, Biokimia dan Teknologi Pascapanen, Pusat Antar Universitas-Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta (1990) 21 dan 58.

8. FAHN, A., Anatomi Tumbuhan, Edisi ketiga, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta (1982) 425.

Keterangan :

2 = K20
3 = K25
4 = K30

6 = P20
7 = P25
8 = P30

Keterangan : 1 = Kidang

2 = K20
3 = K25
4 = K30

5 = Pelanduk
6 = P20
7 = P25
8 = P30

Keterangan : 1 = Kidang

2 = K20
3 = K25
4 = K30

5 = Pelanduk
6 = P20
7 = P25
8 = P30

Keterangan : 1 = Kidang

2 = K20
3 = K25
4 = K30

5 = Pelanduk
6 = P20
7 = P25
8 = P30

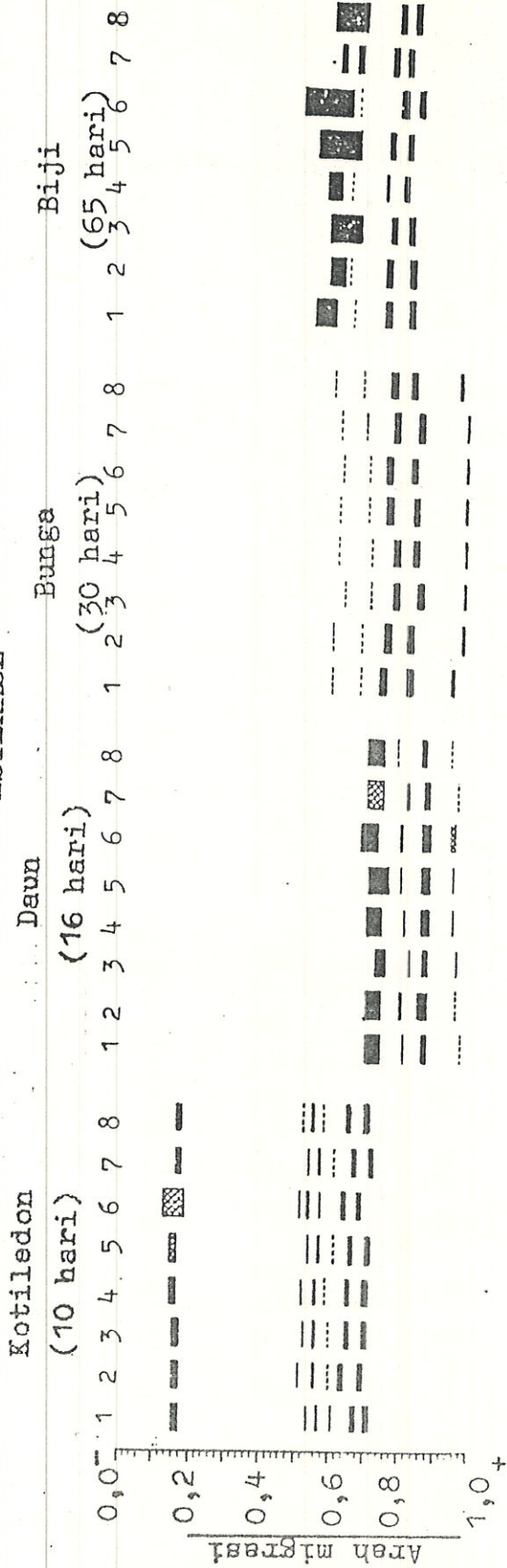
Keterangan : 1 = Kidang

2 = K20
3 = K25
4 = K30

5 = Pelanduk
6 = P20
7 = P25
8 = P30

- Gambar 1. Zimogram esterase kotiledon, daun, bunga, dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.
- Gambar 2. Zimogram peroksidase kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.
- Gambar 3. Zimogram fosfatase asam kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.
- Gambar 4. Zimogram enzim malat kotiledon, daun, dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25 dan P30.
- Gambar 5. Zimogram alkohol dehidrogenase kotiledon dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.

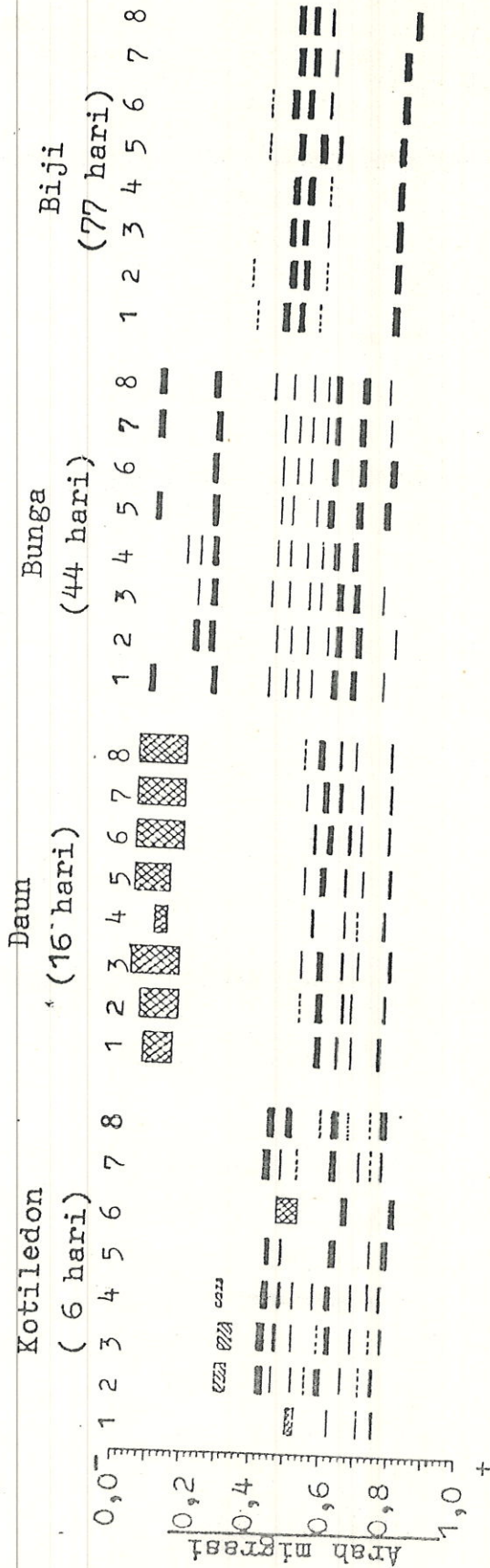
ESTERASE



Keterangan : 1 = Kidang
 2 = K20
 3 = K25
 4 = K30
 5 = Pelanduk
 6 = P20
 7 = P25
 8 = P30

Gambar 1. Zimogram esterase kotiledon, daun, bunga, dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.

PEROKSIDASE

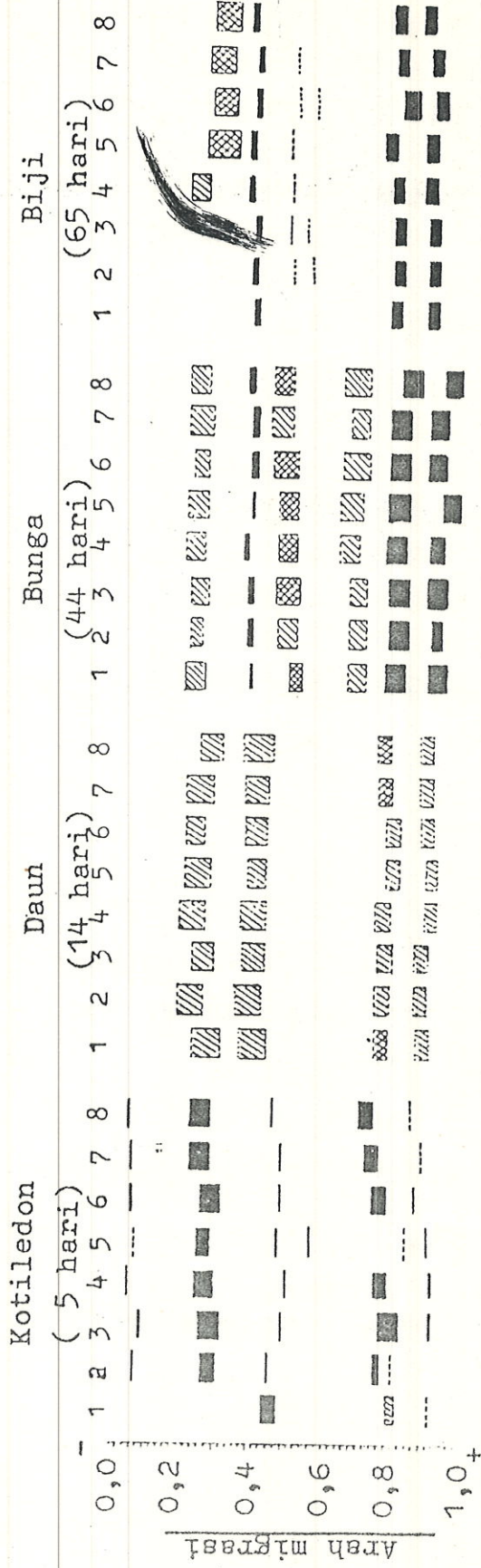


Keterangan : 1 = Kidang
2 = K20
3 = K25
4 = K30

5 = Pelanduk
6 = P20
7 = P25
8 = P30

Gambar 2. Zimogram peroksidase kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.

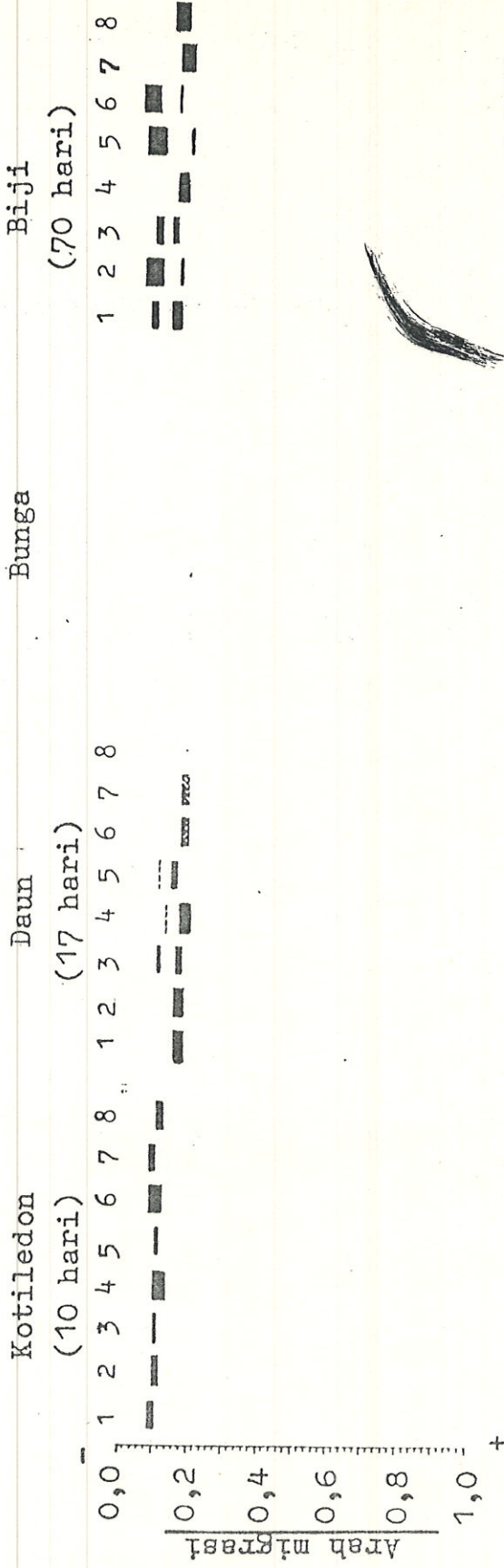
FOSFATASE ASAM



Keterangan : 1 = Kidang
 2 = K20
 3 = K25
 4 = K30
 5 = Pelanduk
 6 = P20
 7 = P25
 8 = P30

Gambar 3. Zimogram fosfatase asam kotiledon, daun, bunga dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.

ENZIM MALAT



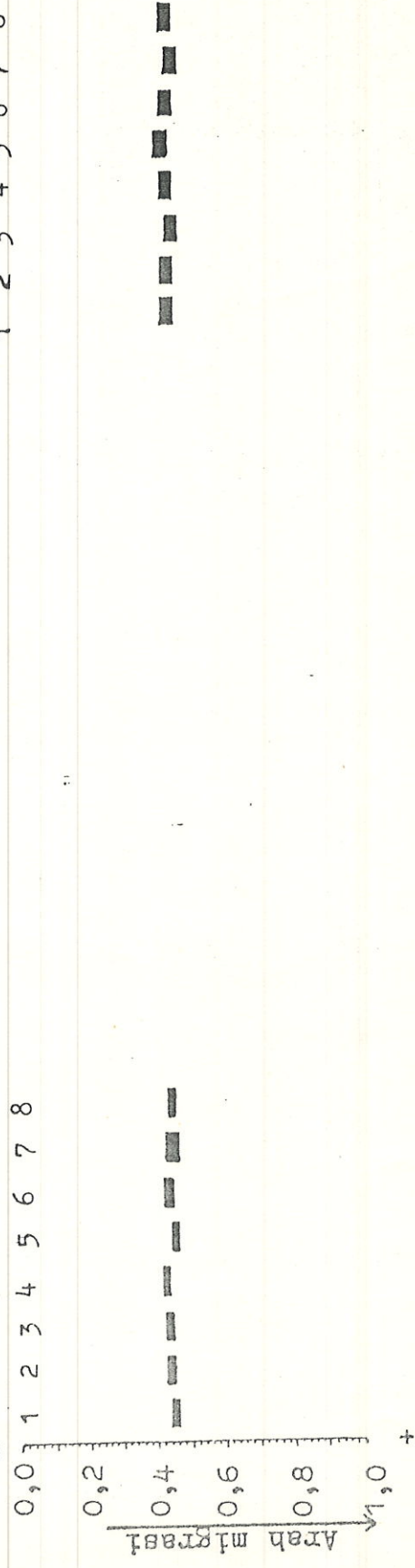
Keterangan : 1 = Kidang
 2 = K20
 3 = K25
 4 = K30

5 = Pelanduk
 6 = P20
 7 = P25
 8 = P30

Gambar 4. Zimogram enzim malat kotiledon, daun, dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, K20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25 dan P30.

ALKOHOL DEHIDROGENASE

Kotiledon (6 hari)	Daun	Bunga	Biji (63 hari)
1 2 3 4 5 6 7 8			1 2 3 4 5 6 7 8



Keterangan : 1 = Kidang
 2 = K20
 3 = K25
 4 = K30

5 = Pelanduk
 6 = P20
 7 = P25
 8 = P30

Gambar 5. Zimogram alkohol dehidrogenase kotiledon dan biji mentah kacang tanah varietas Kidang, P20, K25, K30, varietas Pelanduk, P20, P25, dan P30.