

ANALISIS KEKERABATAN TANAMAN KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) ANTARA VARIETAS BERCABANG BANYAK DAN SEDIKIT BERDASARKAN POLA RFLP DAN MORFOLOGI PERCABANGANNYA

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang biologi

Oleh:
RETNO PUJIHASTUTI

0210910033-91

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2008**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ANALISIS KEKERABATAN TANAMAN KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) ANTARA VARIETAS BERCABANG BANYAK DAN SEDIKIT BERDASARKAN POLA RFLP DAN MORFOLOGI PERCABANGANNYA

Oleh:
RETNO PUJIHASTUTI
0210910033-91

telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 11 April 2008
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Ir. Estri Laras A. Msc. St.
NIP. 131 759 546

Dr. Wahyu Widoretno, MSi.
NIP. 131 837 696

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Agung Pramana W. M., M.Si.
NIP. 131 970 480

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retno Pujihastuti
NIM : 0210910033-91
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul:

ANALISIS KEKERABATAN TANAMAN KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) ANTARA VARIETAS BERCABANG BANYAK DAN SEDIKIT BERDASARKAN POLA RFLP DAN MORFOLOGI PERCABANGANNYA

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Tugas akhir ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka TA ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila dikemudian hari diketahui bahwa isi TA saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 11 April 2008
Yang menyatakan,

(Retno Pujihastuti)
NIM. 0210910033-91

ANALISIS KEKERABATAN TANAMAN KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merr.) ANTARA VARIETAS BER CABANG BANYAK DAN SEDIKIT BERDASARKAN POLA RFLP DAN MORFOLOGI PERCABANGANNYA

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pola restriksi DNA dan hubungan kekerabatan kedelai varietas bercabang banyak dan sedikit berdasarkan percabangannya serta pola restriksi RFLP DNA. Varietas kedelai yang digunakan dalam penelitian ini adalah varietas Sibayak, Tanggamus, Argomulyo, Burangrang, Anjasmoro, Panderman, Ijen, Kaba, Wilis, dan Sinabung. Pengamatan morfologi percabangan meliputi panjang cabang, jumlah cabang dan jumlah nodus cabang. Pola restriksi DNA kedelai didapatkan dengan metode RFLP menggunakan 3 enzim (*EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*). Varietas kedelai yang diamati dapat digolongkan menjadi tanaman kedelai bercabang banyak (≥ 3 cabang) yaitu Burangrang, Panderman, Sibayak, Ijen, Kaba, Tanggamus, dan Wilis dan tanaman kedelai bercabang sedikit (< 3 cabang) yaitu varietas Anjasmoro, Argomulyo, dan Sinabung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pola restriksi 3 enzim pada DNA kedelai bervariasi. Fragmen yang khas untuk cabang banyak pada pola restriksi *EcoRI* berukuran 900 Pb, pada pola restriksi *BamHI* berukuran 1000 Pb, dan pada pola restriksi *PstI* berukuran 400 Pb. Kekerabatan 10 varietas tanaman kedelai berdasarkan morfologi percabangan tidak selalu dipengaruhi oleh jumlah cabang, melainkan juga dipengaruhi oleh panjang cabang dan nodus pada cabang. Kekerabatan 10 varietas kedelai berdasarkan morfologi percabangan berbeda dengan kekerabatan berdasarkan gabungan pola restriksi 3 enzim. Terhambatnya ekspresi gen percabangan akibat kondisi lingkungan mempengaruhi hubungan kekerabatan 10 varietas tanaman kedelai.

Kata kunci: *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, RFLP, *Glycine max*.

**PHENETIC RELATIONSHIPS ANALYSIS OF SOYBEAN
PLANT (*Glycine max* [L.] Merr) BETWEEN MORE
BRANCHING VARIETY AND LESS BRANCHING VARIETY
DEPENDS ON RFLP PATTERN AND THEIR BRANCHING
MORPHOLOGY**

ABSTRACT

This research was aimed to observe restriction pattern of soybean DNA and the phenetic relationship between less branches soybean variety and more branches variety depends on their restriction pattern and their branching morphology. Soybean varieties used in this research are Sibayak, Tanggamus, Argomulyo, Burangrang, Anjasmoro, Panderman, Ijen, Kaba, Wilis, and Sinabung. The observation of branching morphology includes branch length, branches sum and branch nodes sum. The restriction pattern of soybean DNA made by RFLP method with 3 enzymes (*EcoRI*, *BamHI*, *PstI*). The observed soybean varieties is classified by branches sum. Varieties having more equal to 3 branches are Burangrang, Panderman, Sibayak, Ijen, Kaba, Tanggamus, Wilis. Varieties having less 3 branches are Anjasmoro, Argomulyo, Sinabung. The result shows the restriction pattern of 3 enzymes in soybean DNA is vary each other. The typical fragment length for more branches variety in *EcoRI* restriction fragment is 900 bp, in *BamHI* restriction fragment is 1000 bp, in *PstI* restriction fragment is 400 bp. The phenetic relationship between 10 soybeans varieties generally is not always influenced by branches sum. These shown by the relation between more branches varieties with less branches varieties. The relation of 10 soybean varieties depends on their branching morphology not always influenced by branches sum, but also branch length and branch nodes sum. The relation of 10 soybean varieties depends on branching morphology is different with their restriction pattern. The resistancy of expressing branching gene by environment might be influence their phenetic relationship.

Key words : *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, RFLP, *Glycine max*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Illahi Robbi atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya yang tak terhingga sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul Analisis Kekerabatan Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) Antara Varietas bercabang Banyak Dan Sedikit Berdasarkan Pola RFLP Dan Morfologi Percabangannya.

Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini tidak akan mendapatkan suatu hasil yang baik tanpa adanya bimbingan, bantuan, motivasi, dan saran, serta doa dari berbagai pihak, utamanya kepada:

1. Dr. Ir. Estri Laras A. Msc. St. dan Dr. Wahyu Widoretno, MSi. sebagai pembimbing
2. Dra. Fatchiyah M.Kes PhD., Nunung Harijati, PhD., dan Rodliyati Azrianingsih PhD. sebagai penguji
3. Ayah (Kartiko Purnomo), Ibu (Sri Multi Hariyani), Adik (Satrio Pinandito) sebagai keluarga yang sempurna
4. Rifyal Djusdal, S.Si, sebagai teman curhatku
5. Penghuni KL I / 77 sebagai mitra untuk belajar hidup bersama menggapai cita-cita
6. Teman-temanku yang tak henti-hentinya memberi semangat
7. dan Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu, penulis ucapkan terima kasih atas perhatian dan bantuannya

Dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari bahwa penulisan Tugas Akhir ini jauh dari sempurna. Oleh karena itu perbaikan melalui saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Dan semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, Amin.

Malang, 11 April 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	1
HALAMAN PENGESAHAN	2
HALAMAN PERNYATAAN	3
ABSTRAK	4
ABSTRACT	5
KATA PENGANTAR	6
DAFTAR ISI	7
DAFTAR GAMBAR	9
DAFTAR TABEL	10
DAFTAR LAMPIRAN	11
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	12
1.2 Perumusan Masalah	14
1.3 Tujuan Penelitian	14
1.4 Manfaat Penelitian	14
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.	
2.1 Karakteristik Varietas Tanaman Kedelai (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	15
2.2 Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan tanaman kedelai	18
2.3 Pengaruh Variasi Genetik Terhadap Pola RFLP	20
2.4 Enzim Restriksi yang digunakan Dalam RFLP	22
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	25
3.2 Bahan Tanaman dan Metode Penanaman	25
3.3 Evaluasi pola Percabangan	26
3.4 Evaluasi Profil DNA dengan Metode RFLP	
3.4.1. Isolasi DNA Tanaman Kedelai	26
3.4.2. Perhitungan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA dengan Spektrofotometer	27
3.4.3. Pemotongan DNA dengan metode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	27
	7

3.4.4. Visualisasi DNA hasil pemotongan enzim restriksi dengan Elektroforesis Agarose 2%..... 28

3.5 Analisis Data 28

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Percabangan 10 Varietas Tanaman Kedelai 29

4.2 Profil pita restriksi DNA kedelai hasil pemotongan 3 Enzim dengan teknik RFLP..... 31

4.3 Hubungan kekerabatan antara 10 varietas kedelai berdasarkan pola morfologi cabang dan pola restriksi DNA..... 36

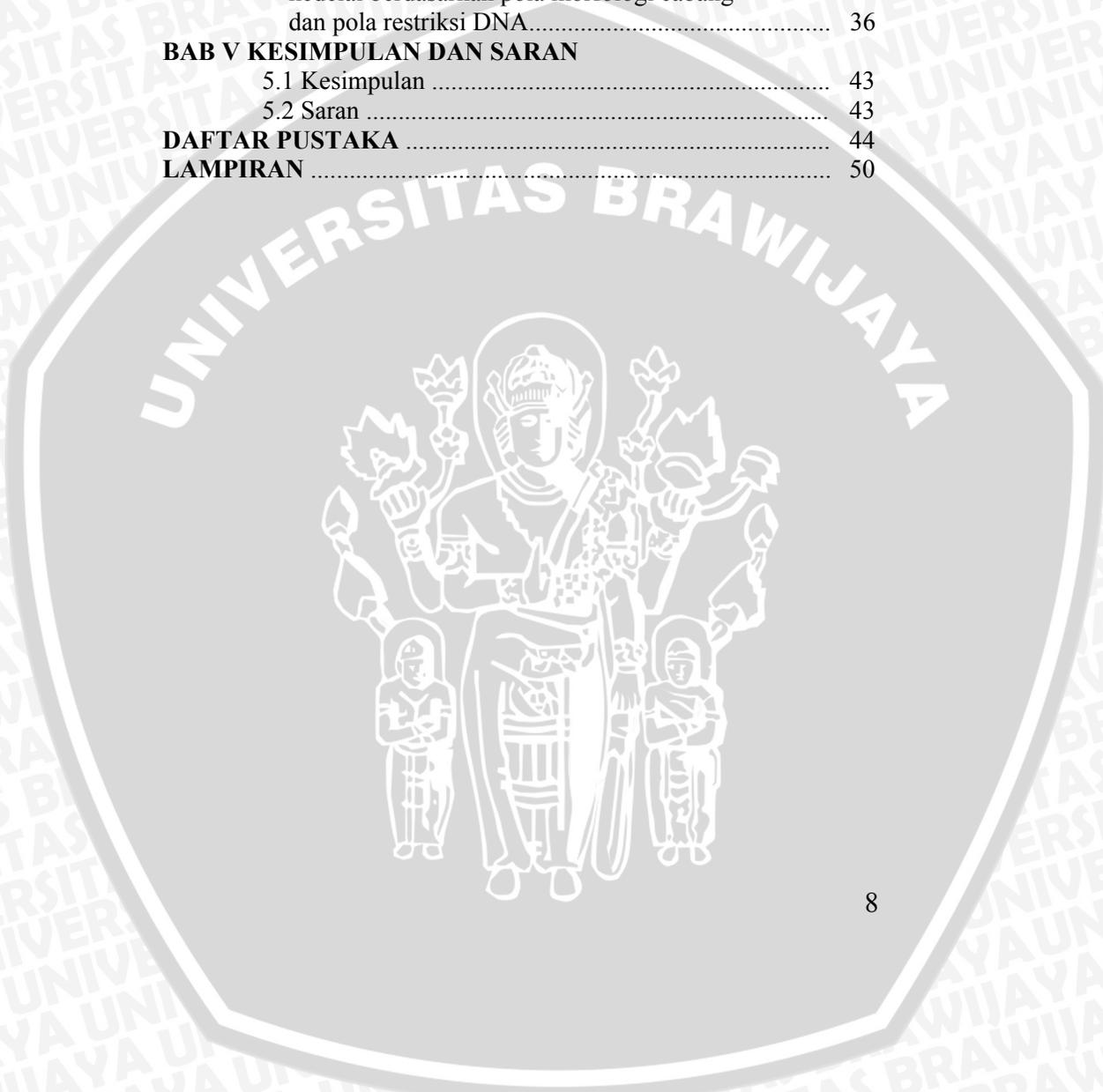
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan 43

5.2 Saran 43

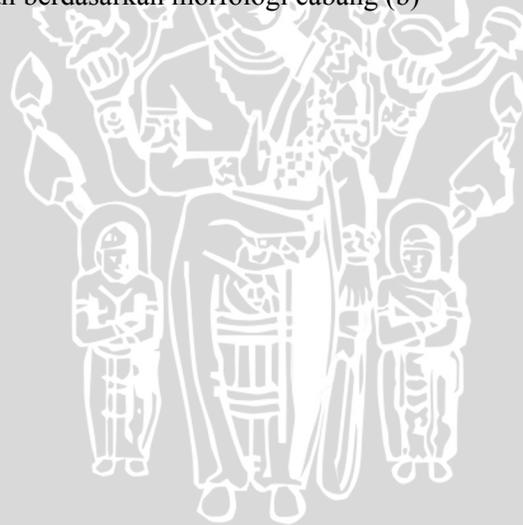
DAFTAR PUSTAKA 44

LAMPIRAN 50



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1. Percabangan pada tanaman kedelai (a) Varietas Kaba yang mewakili kedelai bercabang banyak dan (b) Varietas Argomulyo yang mewakili kedelai bercabang sedikit.	30
Gambar 4.2. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim <i>EcoRI</i>	32
Gambar 4.3. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim <i>BamHI</i>	33
Gambar 4.4. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim <i>PstI</i>	34
Gambar 4.5. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan morfologi cabang	37
Gambar 4.6. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim <i>EcoRI</i>	38
Gambar 4.7. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim <i>BamHI</i>	39
Gambar 4.8. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim <i>PstI</i>	40
Gambar 4.9. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi gabungan 3 enzim (a) dan berdasarkan morfologi cabang (b)	42



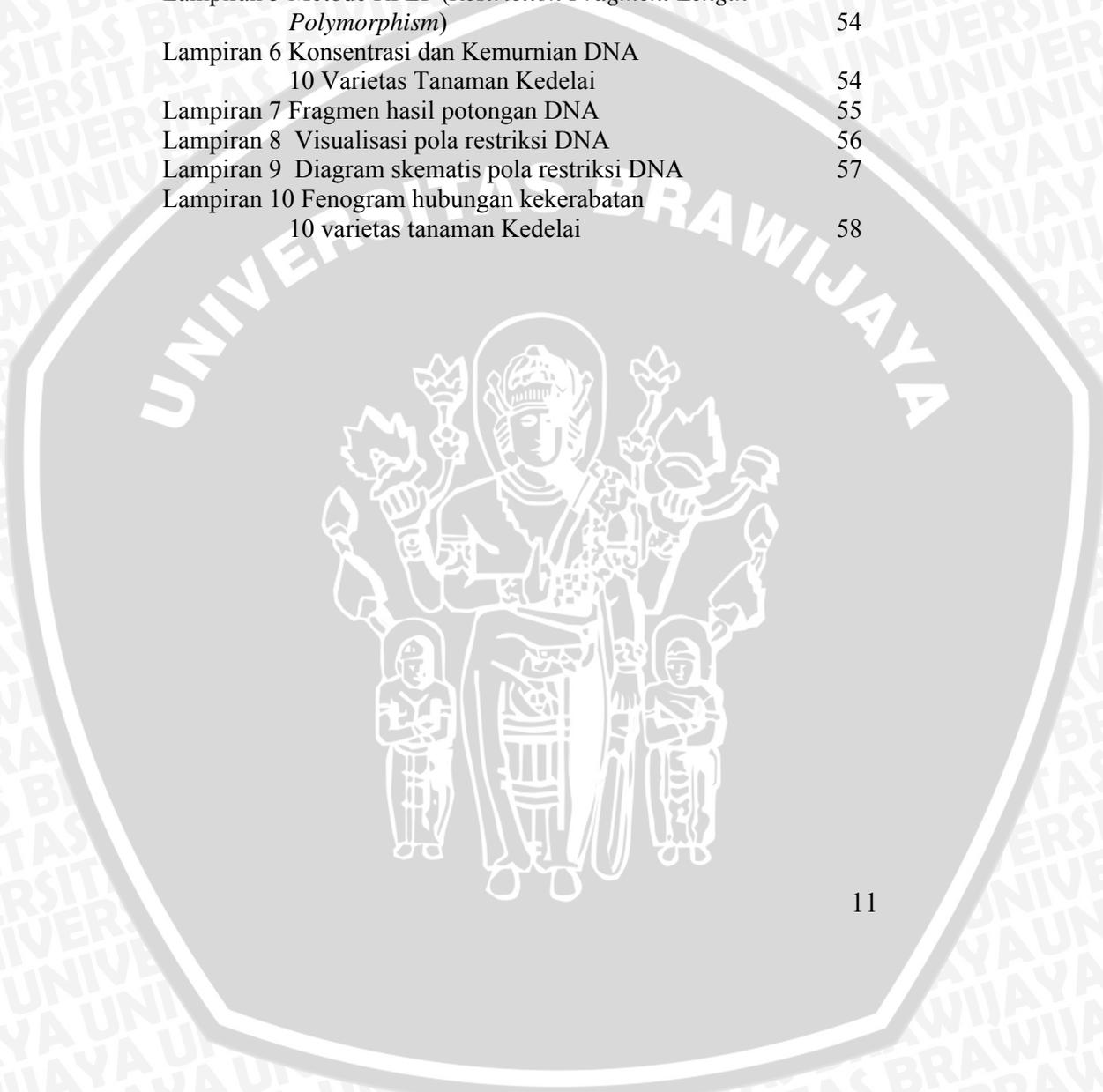
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Beberapa jenis Enzim Tipe II dan sisi pengenalan serta sisi pemotongannya	23
Tabel 4.1. Hasil pengamatan deskripsi percabangan pada tanaman kedelai berdasarkan hasil penelitian	30



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Bahan-bahan yang diperlukan dalam Isolasi DNA	50
Lampiran 2 Rancangan Penelitian	51
Lampiran 3 Isolasi DNA – Metode CTAB	52
Lampiran 4 Metode Elektroforesis Agarose 2%	53
Lampiran 5 Metode RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	54
Lampiran 6 Konsentrasi dan Kemurnian DNA 10 Varietas Tanaman Kedelai	54
Lampiran 7 Fragmen hasil potongan DNA	55
Lampiran 8 Visualisasi pola restriksi DNA	56
Lampiran 9 Diagram skematis pola restriksi DNA	57
Lampiran 10 Fenogram hubungan kekerabatan 10 varietas tanaman Kedelai	58



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan salah satu jenis tanaman terna yang penting di Indonesia (Suprpto, 1992). Tanaman ini merupakan tanaman budidaya yang telah dikenal sejak lama (Martin dkk., 1967). Berdasarkan klasifikasi tanaman kedelai termasuk dalam Divisio *Magnoliophyta*, Kelas *Magnoliopsida*, Ordo *Fabales*, Famili *Fabaceae*, Sub-Famili *Faboideae*, Genus *Glycine* dan Species *Glycine max* (L.) Merr. (Benson, 1957). Sebagai salah satu jenis tanaman kelas *Dicotyledoneae*, tanaman kedelai memiliki ciri-ciri tanaman dikotil diantaranya memiliki batang yang bercabang (Tjitrosoepomo, 2000).

Rosenszweig dkk. (2003) menyatakan, pola percabangan pada tanaman dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Salah satu faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi pola percabangan adalah area penanaman dan perubahan musim. Eckardt (2006) menambahkan, area penanaman yang kurang luas dapat menghalangi pertumbuhan cabang sehingga dapat mengurangi jumlah dan ukuran cabang sedangkan perubahan musim dapat mempengaruhi perkembangan dominansi apikal yang menentukan terbentuk atau tidaknya suatu cabang.

Pola percabangan merupakan salah satu sifat pada tanaman kedelai yang dapat diamati (fenotip). Menurut Yuwono (2005), fenotip atau sifat yang dapat diamati pada suatu individu merupakan hasil ekspresi komposisi genetik berupa gen-gen yang tersusun dalam untaian DNA. Fenotip merupakan hasil kerja sama antara faktor genotip dan lingkungan. Potensi genotip itu tetap, namun pengekspresian potensi tersebut dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Gen yang bersifat tetap dapat dideteksi dengan berbagai macam metode analisis genetik yaitu dengan metode *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Hal ini perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa fenotip merupakan cerminan dari suatu gen (genotip).

Arumingtyas (2006) menyatakan, pola percabangan merupakan salah satu fenotip yang diatur oleh gen percabangan

sehingga pola percabangan dapat diwariskan dari satu tanaman ke tanaman lainnya. Suhartina (2005) menambahkan, ada beberapa varietas lokal tanaman kedelai di Indonesia yang sudah diidentifikasi pola percabangannya yaitu varietas Anjasmoro, Argo mulyo, Burangrang, Sibayak, dan Tanggamus, masing-masing varietas tersebut memiliki tipe percabangan yang beragam. Keberagaman pola percabangan antar varietas tanaman kedelai tersebut mencerminkan keragaman genetik dari varietas-varietas tersebut. Namun belum diketahui hubungan keberagaman pola percabangan dengan kekerabatan antar varietas tanaman kedelai. Maka sebagai langkah awal deteksi keragaman genetik dari keragaman pola percabangan maka perlu dilakukan analisis hubungan kekerabatan.

Teknik RFLP jika dibandingkan dengan metode-metode lainnya merupakan teknik dasar yang perlu dilakukan sebelum dilanjutkan pada tahap analisa yang dilakukan oleh metode lainnya. Hal ini perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil analisa yang lebih akurat (Campbell, 2001). Arumingtyas (2006) menambahkan, metode RFLP ini memiliki beberapa kelebihan yaitu metode ini termasuk metode sederhana dalam analisis tingkat molekuler. Selain itu teknik RFLP dapat memotong sekuen DNA tanpa mengetahui struktur DNA yang akan dipotong. Sehingga hasilnya dapat dijadikan informasi awal bagi metode analisis lainnya (Rbowen, 2000).

RFLP merupakan suatu teknik yang digunakan untuk membedakan suatu organisme berdasarkan pola hasil pemotongan DNA oleh enzim restriksi. Persamaan dan perbedaan pola potongan yang dihasilkan dapat digunakan untuk membedakan spesies bahkan sampai tingkat strain, serta dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar individu (Hill, 2006 dan Tamarin, 2002). Ada berbagai jenis enzim restriksi yang dapat digunakan dalam teknik RFLP ini. Glick dan Pasternak (1998) menambahkan, enzim yang sering digunakan untuk melihat hubungan kekerabatan adalah enzim restriksi tipe II. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis kekerabatan antar varietas tanaman kedelai melalui analisa komposisi genetik (RFLP) dan morfologi percabangan. Hasil analisis kekerabatan tersebut dapat digunakan sebagai acuan dasar penentuan varietas bahan pemuliaan dan sebagai informasi tambahan dalam bidang taksonomi kedelai.

1.2. Perumusan Masalah

1. Bagaimana pola restriksi DNA kedelai varietas bercabang sedikit dan varietas bercabang banyak menggunakan enzim restriksi *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*?
2. Bagaimana hubungan kekerabatan antara kedelai varietas bercabang sedikit dengan varietas yang bercabang banyak berdasarkan percabangannya serta pola restriksi RFLP DNA?

1.3. Tujuan

1. Untuk mengetahui pola restriksi DNA pada kedelai varietas bercabang sedikit dan varietas bercabang banyak hasil pemotongan enzim restriksi *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*.
2. Untuk mengetahui hubungan kekerabatan kedelai antara varietas bercabang sedikit dengan varietas yang bercabang banyak berdasarkan percabangannya serta pola restriksi RFLP DNA.

1.4. Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi genetik maupun pola percabangan sebagai acuan dasar dalam usaha persilangan (hibridisasi) tanaman kedelai untuk mendapatkan varietas unggul. Sehingga secara tidak langsung dapat meningkatkan produksi dari kedelai di Indonesia. Dengan diketahuinya hubungan kekerabatan antara beberapa varietas kedelai maka dapat dijadikan informasi tambahan dalam bidang taksonomi.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakteristik Varietas Tanaman Kedelai (*Glycine max* L. Merr.)

Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) diklasifikasikan ke dalam Divisio *Magnoliophyta*, Kelas *Magnoliopsida*, Ordo *Fabales*, Famili *Fabaceae*, Sub-Famili *Faboideae*, Genus *Glycine* dan Species *Glycine max* (L.) Merr. (Benson, 1957).

Kedelai merupakan tanaman terna semusim yang tumbuh tegak dan memiliki morfologi yang beragam. Tinggi tanaman Kedelai berkisar antara 20 hingga 150 cm, dapat bercabang sedikit atau banyak bergantung varietas dan lingkungan hidupnya. Daun merupakan daun majemuk trifoliatius yang berbentuk lonjong dan letaknya berselang-seling (Progressio Indonesia, 2003). Tanaman kedelai memiliki 8 hingga 24 buku diatas daunnya. Semakin banyak ruas atau buku yang dimiliki tanaman kedelai, maka semakin banyak organ generatif yang terbentuk. Banyaknya organ generatif berupa bunga, buah, dan biji yang terbentuk akan meningkatkan produksi kedelai (Somaatmadja, 1993).

Bunga kedelai termasuk bunga lengkap, muncul di ketiak daun, berbentuk kupu-kupu, berwarna putih, hijau atau ungu. Penyerbukan tipe kleistogami yaitu pada saat bunga masih tertutup. Waktu yang dibutuhkan selama proses penyerbukan yang diikuti dengan pembuahan berkisar antara 8-10 jam (Sumarno, 1993).

Buah kedelai berbentuk polong, setiap polong dapat berisi 1-5 biji, namun umumnya sebagian besar varietas kedelai memiliki 2-3 biji per polong. Polong pertama akan tampak 10-14 hari setelah munculnya bunga pertama. Pada kondisi yang normal, pembentukan polong memerlukan waktu kurang lebih 21 hari. Jumlah polong yang terbentuk dalam satu tanaman bervariasi, bergantung varietas, kesuburan tanah, dan jarak tanam (Suprpto, 2002).

Bentuk biji kedelai berbeda-beda bergantung varietas, yakni bulat, agak pipih, dan bulat telur, namun sebagian besar biji berbentuk bulat telur. Warna kulit biji bermacam-macam,

ada yang kuning, hitam, hijau, atau coklat. Bobot kering biji tiap 100 butir berkisar antara 5-30 gram (Suprpto, 2002).

Sedangkan berdasarkan tipe pertumbuhannya batang kedelai dibagi menjadi tiga tipe, yaitu tipe determinit, semi-determinit dan indeterminit. Tipe determinit memiliki ukuran ujung batang yang hampir sama besar dengan batang bagian tengah dan tingginya termasuk kategori pendek sampai sedang. Tipe semi-determinit mempunyai ciri gabungan antara tipe determinit dan tipe indeterminit. Tipe indeterminit mempunyai ujung batang yang lebih kecil dibandingkan dengan batang pada bagian tengah, ruas-ruas batangnya panjang dan agak melilit, tingginya termasuk kategori sedang sampai tinggi (Rukmana, 1996).

Tanaman kedelai memiliki dua periode tumbuh, yaitu periode vegetatif dan periode reproduktif. Periode vegetatif adalah periode tumbuh, dimulai dengan munculnya kecambah dari permukaan tanah sampai sebelum terbentuknya bunga pertama. Periode vegetatif sebagian besar tanaman Kedelai berkisar antara 4-5 minggu (Keshun, 1997). Periode reproduktif dimulai sejak pembentukan kuncup-kuncup ketiak yang berkembang membentuk kelopak-kelopak bunga. Umur tanaman Kedelai sampai dengan polong masak bergantung pada varietas. Polong Kedelai umumnya matang pada umur antara 75 sampai dengan 110 hari setelah tanam dan umumnya dapat dipanen mulai umur 80 hari (Suprpto, 2002).

Sakino (1992) mengatakan, saat panen yang tepat bagi tanaman kedelai adalah pada saat daun-daun kedelai gugur dan 2/3 dari rangkaian kulit polong telah berubah menjadi coklat tua, walaupun sebagian kulit polong masih hijau atau kuning. Suprpto (2002) menambahkan, hal tersebut untuk menghindari biji kedelai membusuk pada musim hujan dan menghindari hilangnya biji kedelai pada musim kemarau akibat retaknya kulit polong.

Suhartina (2005) menyatakan, Indonesia mempunyai banyak varietas tanaman kedelai. Dalam penelitian ini digunakan 10 varietas kedelai yaitu varietas Wilis, Argo Mulyo, Burangrang, Sinabung, Kaba, Tanggamus, Sibayak, Anjasromo, Ijen, dan Panderman. 10 varietas tanaman kedelai tersebut terdiri dari 5 varietas yang diketahui secara pasti jumlah

percabangannya dan 5 varietas yang belum diketahui secara pasti jumlah percabangannya. Varietas yang diketahui secara pasti jumlah percabangannya yaitu Argo Mulyo, Burangrang, Tanggamus, Sibayak, dan Anjasmoro. Sedangkan varietas yang belum diketahui secara pasti jumlah percabangannya yaitu Wilis, Sinabung, Kaba, Ijen dan Panderman. Masing-masing varietas memiliki karakteristik yang berbeda. Berikut karakteristik dari masing-masing varietas yang digunakan dalam penelitian ini :

- 1) Wilis merupakan varietas kedelai hasil persilangan antara varietas orba dengan varietas no.1682. Memiliki masa pematangan polong antara 85-90 hari. Tinggi tanaman kedelai varietas \pm 50 cm dengan bentuk biji oval agak pipih, hasil panennya mencapai 1,6 ton/ha.
- 2) Argo Mulyo merupakan varietas introduksi dari Thailand. Varietas ini memiliki masa panen antara 80-82 hari. Tinggi tanamannya mencapai 40 cm yang memiliki jumlah cabang antara 3-4 cabang, mempunyai hasil panen sekitar 1,5-2,0 ton/ha.
- 3) Burangrang merupakan hasil alami dari daerah Jember Jawa Timur. Varietas ini memiliki umur matang antara 80-82 hari. Tinggi tanaman kedelai varietas ini mencapai 60-70 cm dengan jumlah percabangan antara 1-2 cabang, hasil panennya sekitar 1,6-2,5 ton/ha.
- 4) Sinabung merupakan hasil persilangan ganda antara 16 tetua. Memiliki masa panen hingga 88 hari dan memiliki tinggi batang hingga 66 cm. Bentuk biji dari varietas ini berbentuk lonjong. Varietas ini belum diketahui jumlah percabangannya tetapi sudah dapat disimpulkan oleh petugas Balitkabi (Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian) bahwa varietas ini bercabang, hasil panen rata-ratanya mencapai 2,16 ton/ha.
- 5) Kaba juga merupakan hasil persilangan ganda antara 16 tetua. Varietas ini memiliki masa panen hingga 85 hari. Tinggi tanaman kedelai varietas ini mencapai 64 cm dengan bentuk biji lonjong, mempunyai hasil panen mencapai 2,13 ton/ha.
- 6) Tanggamus merupakan hasil persilangan kedelai varietas kerinci dengan varietas no.3911. Masa panen dari varietas ini mencapai 88 hari. Tinggi dari tanaman varietas ini mencapai

67 cm dengan jumlah percabangan antara 3-4 cabang, dan bentuk bijinya oval, hasil panennya 1,22 ton/ha.

7) Sibayak merupakan hasil persilangan antara varietas Dempo dengan varietas no.3577. Varietas ini memiliki masa panen hingga 89 hari. Tanaman kedelai varietas ini memiliki tinggi hingga 74 cm dengan jumlah percabangan antara 3-4 cabang dan bentuk bijinya oval, hasil panen rata-ratanya 1,41 ton/ha.

8) Anjasmoro merupakan galur murni berasal dari Mansuria. Umur matang dari polongnya antara 82,5-92,5 hari. Tinggi tanaman kedelai varietas ini 64-68 cm, dengan jumlah percabangan antara 2,9-5,6 cabang, hasil panennya berkisar 2,03-2,25 ton/ha.

9) Ijen merupakan hasil persilangan antara varietas Wilis dengan varietas Himeshirazu. Umur masak dari varietas ini mencapai 83 hari, dengan tinggi 51 cm dan bentuk biji lonjong, hasil panennya berkisar 2,15-2,49 ton/ha.

10) Panderman merupakan hasil introduksi dari Taiwan. Varietas ini memiliki umur masak hingga 85 hari dengan tinggi 44 cm dan bentuk biji agak bulat, rata-rata hasil panennya mencapai 2,11 ton/ha.

2.2. Pengaruh faktor lingkungan terhadap pertumbuhan tanaman kedelai

Tanaman kedelai di Pulau Jawa ditanam pada empat musim, yaitu pada awal musim hujan sekitar bulan Oktober–November, pertengahan musim hujan sekitar bulan Februari–Maret, akhir musim hujan sekitar bulan April–Mei dan musim kemarau sekitar bulan Juli. Curah hujan tahunan dibawah 2000 mm atau 300-500 mm per musim tanam sesuai untuk bertanam kedelai yang dapat dihubungkan dengan faktor-faktor lingkungan lain. Tanah, iklim, varietas dan teknologi yang digunakan manusia dapat mempengaruhi pertumbuhan suatu jenis tanaman. Masa penanaman yang tidak tepat dapat menghambat pertumbuhan tanaman kedelai, berupa serangan hama lalat kacang (*Agromyza phaseoli*), tanah yang terlalu basah, kekeringan akibat keterlambatan masa tanam dan lamanya

waktu tumbuh tanaman kedelai (Rozari & Muharwan, 1986).

Faktor-faktor lingkungan lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman kedelai adalah sebagai berikut :

a) Unsur hara

Unsur hara yang diperlukan oleh tanaman kedelai terdiri atas unsur hara primer (N, P, dan K), unsur sekunder (Ca, Mg, dan S), dan unsur hara mikro (B, Cl, Cu, Fe, Mn, dan Zn). Unsur hara primer dibutuhkan oleh tanaman kedelai dalam jumlah yang lebih banyak daripada unsur hara sekunder dan unsur hara mikro. Kedelai menggunakan sekitar 132 kg N untuk pertumbuhan vegetatif dan pembentukan biji dalam waktu 4 sampai 5 bulan dengan hasil 1,5 ton per hektar. Sedangkan jumlah P yang diberikan pada tanaman kedelai berkisar antara 45-90 kg per hektar sedangkan untuk mendapatkan keseimbangan hara di dalam tanah, pemupukan K pada tanaman kedelai diberikan sebanyak 25-50 kg per hektar (Suprpto, 2002).

b) Kondisi tanah

Kedelai dapat tumbuh di tanah dengan pH antara 5,8-7, meskipun pada tanah dengan pH sekitar 5,5 tanaman kedelai masih dapat bereproduksi. Pada pH tanah kurang dari 5,5 pertumbuhan kedelai sangat terhambat karena keracunan Al dan Fe yang ditandai dengan kondisi tanaman yang tumbuh kerdil (Sumarno & Harnoto, 1983).

c) Air

Tanaman kedelai memerlukan air mulai dari fase perkecambah sampai pematangan. Pengaruh kekurangan air pada setiap fase pertumbuhan akan menyebabkan penurunan hasil panen. Kebutuhan air tanaman kedelai pada setiap fasenya yaitu : pertumbuhan awal vegetasi aktif (30 hari) sebanyak 106-124 mm, tahap pembungaan atau pengisian polong (35 hari) sebanyak

124-143 mm, dan tahap pematangan biji (20 hari) sebanyak 73-83 mm (Fagi dan Tangkuman, 1985).

d) Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman termasuk tanaman kedelai. Pada suhu 30°C, umumnya tanaman mengalami perkecambahannya yang optimal. Apabila air mencukupi, tanaman kedelai masih dapat tumbuh baik pada suhu yang cukup tinggi (36°C) dan pertumbuhan tanaman kedelai akan sangat terganggu pada suhu 39°C (Baharsjah dkk, 1993).

e) Cahaya matahari

Lama penyinaran matahari optimal untuk kedelai sebesar 66,67%-83,33% (Asianto 1978). Baharsjah, dkk (1989) menambahkan, lama penyinaran matahari yang panjang dan suhu tinggi mengakibatkan terbentuknya biji kedelai yang besar dan dapat meningkatkan hasil. Penurunan intensitas cahaya matahari sebesar 40% sejak perkecambahannya dapat mengakibatkan penurunan jumlah buku, cabang, diameter batang, jumlah polong, dan hasil biji sampai 32% (Sumarno & Harnoto, 1983).

2.3. Pengaruh Variasi Genetik Terhadap Pola RFLP

Variasi hayati meliputi variasi spesies, komunitas dan ekosistem, pada skala yang lebih kecil mencakup variasi genetik di antara individu dalam suatu populasi. Variasi tersebut terletak pada perbedaan sekuens DNA. Variasi genetik dipelajari untuk mengetahui variasi gen yang selanjutnya tampak sebagai fenotip dalam suatu populasi (Sofro, 1994).

Sumarno (1993) menyatakan bahwa plasma nutfah adalah sumber genetik yang memiliki variasi genetik luas yang menimbulkan perbedaan populasi, galur, varietas, strain, klon, maupun mutan dari spesies yang sama dan berasal dari lokasi yang berlainan. Menurut Ray (1992), salah satu faktor yang mempengaruhi variasi genetik adalah mutasi. Mutasi merupakan perubahan pada struktur dan molekul materi genetik yang diwariskan pada keturunannya. Materi genetik (gen) yang

terdapat dalam berbagai bentuk sebagai alel yang berlainan, karena mereka mengalami *forward mutation* (mengurangi frekuensi gen liar) dan *back mutation* (meningkatkan frekuensi gen liar).

Suryanto (2003) menambahkan ada beberapa teknik analisa genetik yaitu RAPD (Random Amplified of Polymorphic DNA), PCR (Polymerase Chain Reaction), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), dan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yang dapat mendeteksi variasi genetik dari suatu organisme. RFLP merupakan salah satu teknik molekuler yang relatif lebih menguntungkan, karena dapat dilakukan dengan mudah, cepat dan murah, namun tetap mempunyai akurasi yang tinggi (Grodziker dkk., 1974). Teknik RFLP jika dibandingkan dengan metode-metode lainnya merupakan teknik dasar yang perlu dilakukan sebelum dilanjutkan pada tahap analisa yang dilakukan oleh metode lainnya. Hal ini perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil analisa yang lebih akurat (Campbell, 2001).

Arumingtyas (2006) mengatakan metode RFLP ini memiliki beberapa kelebihan yaitu metode ini termasuk metode sederhana dalam analisis tingkat molekuler dan tidak membutuhkan peralatan khusus, biaya untuk mengawali dan pembentukan marker agak murah. Metode ini juga tidak membutuhkan informasi awal berupa sekuens DNA dalam pelaksanaannya. Kelemahan metode ini yaitu dalam analisisnya memerlukan DNA dengan kualitas tinggi dan jumlah banyak (umumnya 1-10 µg/gel lane).

Nicholl (2002) menerangkan bahwa teknik analisis RFLP pertama kali digunakan untuk memetakan gen-gen. Hasil dari teknik RFLP ini berupa perbedaan dan persamaan panjang fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan oleh enzim restriksi tertentu. RFLP juga dapat digunakan untuk mendeteksi gen-gen yang mengalami mutasi ataupun gen yang normal. Teknik ini sangat kuat dan mampu memetakan banyak gen dari seluruh lokasi kromosom.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) adalah suatu teknik dimana organisme dibedakan dengan analisis pola hasil pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi. Jika dua organisme yang berbeda masing-masing dipotong untai

DNA-nya maka akan menghasilkan pola potongan yang bervariasi (Davidson, 2001). Menurut Campbell (2001), dalam teknik pemotongannya metode RFLP menggunakan enzim restriksi sebagai alat pemotong yang dapat mendeteksi perbedaan sekuens DNA hingga tingkat takson terendah. Enzim restriksi akan memotong sekuens DNA dari seluruh lokasi kromosom. Yuwono (2005), menambahkan ukuran dan struktur DNA antar individu organisme sangat bervariasi. Oleh karena itu hasil pemotongan enzim restriksi akan menghasilkan peta restriksi yang berbeda antar individu organisme. Hal ini disebabkan adanya perbedaan pengenalan sekuens dari lokasi sisi pemotongan enzim dengan sekuens DNA dari varietas yang berbeda.

2.4. Enzim Restriksi yang digunakan dalam RFLP

Enzim restriksi merupakan enzim yang memotong untai molekul DNA pada sekuens spesifik nukleotida tergantung dengan jenis enzim yang digunakan. Panjang untai yang dikenali oleh enzim biasanya berkisar antara 4 sampai 6 pasang basa. Jika untai DNA yang dipotong berasal dari organisme atau individu yang berbeda maka akan menghasilkan hasil potongan yang berbeda dengan ukuran yang berbeda juga. Hasil potongan dari enzim restriksi dapat divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis agarose. Enzim restriksi merupakan hasil isolasi dari beberapa kelompok bakteri sebagai bentuk pertahanan bakteri terhadap serangan virus. Enzim-enzim tersebut diberi nama sesuai dengan nama bakteri (genus) dia berasal pada nama pertama, sedangkan untuk nama kedua berdasar pada nama spesies atau berdasar nama sang penemu (Hill, 2006).

Adam dkk. (1992) menyatakan, enzim Restriksi endonuklease digolongkan dalam tiga tipe yaitu tipe I, II dan III. Enzim restriksi endonuklease tipe I merupakan enzim restriksi endonuklease yang kompleks. Enzim ini mempunyai aktivitas endonuklease sekaligus metilase dan memerlukan ATP, Mg^{2+} dan S-adenosil metionin. Metilase merupakan proses penambahan kelompok metil pada sisi spesifik DNA. Sedangkan ATP, Mg^{2+} , dan S-adenosil sebagai kofaktor. Sisi pengenalan enzim tipe ini berkisar 13 hingga 15 pb, namun memiliki sisi

pemotongan yang tidak spesifik. Enzim yang termasuk dalam enzim tipe ini adalah *E. Coli* B (*EcoB*) dan *E. Coli* K12 (*EcoK*).

Nicholl (2002) menambahkan tipe enzim yang sering digunakan adalah enzim endonuklease tipe II yang memiliki aktivitas yang lebih sederhana. Enzim tipe ini memiliki daerah pemotongan yang spesifik dan terletak pada bagian yang sama. Enzim ini sangat stabil dan hanya memerlukan Mg^{2+} sebagai kofaktor. Enzim-enzim dari tipe ini dapat dibedakan atas urutan nukleotida yang dikenali yaitu dapat berupa urutan empat, lima atau enam basa yang spesifik. Enzim restriksi *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI* termasuk dalam enzim tipe ini. Dua jenis enzim yang sering digunakan adalah *EcoRI* dan *BamHI*. Berikut beberapa jenis enzim lainnya yang termasuk dalam enzim endonuklease tipe II tampak pada tabel 1. Penelitian ini menggunakan 3 enzim restriksi tipe II yaitu enzim *EcoRI*, *BamHI* dan *PstI*. Karakaya, dkk (2002) menggunakan enzim *EcoRI* untuk mendeteksi gen percabangan hasil mutasi pada tanaman kedelai. Barros dkk (2000) menggunakan enzim *BamHI* dan *PstI* untuk mendeteksi gen-gen pada tanaman kedelai.

Tabel 1. Beberapa jenis Enzim Tipe II dan sisi pengenalan serta sisi pemotongannya

Enzim	Sisi Pengenalan	Sisi Pemotongan
<i>BamHI</i>	5'-GGATCC-3'	G ¹ GATCC CCTAG,G
<i>EcoRI</i>	5'-GAATTC-3'	G ¹ AATTC CTAA,G
<i>HaeIII</i>	5'-GGCC-3'	GG ¹ CC CC,GG
<i>HpaI</i>	5'-GTTAAC-3'	GTT ¹ AAC CAA,TTG
<i>PstI</i>	5'-CTGCAG-3'	CTGCA ¹ G G,ACGTC
<i>Sau3A</i>	5'-GATC-3'	¹ GATC CTAG,
<i>SmaI</i>	5'-CCCGGG-3'	CCC ¹ GGG GGG,CCC
<i>SstI</i>	5'-GAGCTC-3'	GAGCT ¹ C C,TCGAG
<i>XmaI</i>	5'-CCCGGG-3'	C ¹ CCGGG GGCC,C

Glick dan Pasternak (1998) berpendapat enzim endonuklease restriksi tipe III juga memotong DNA pada bagian yang spesifik tetapi pada daerah yang berdekatan dengan daerah

pengenalannya. Enzim ini juga memerlukan ATP dan Mg^{2+} untuk aktivitasnya, tetapi tidak mempunyai aktivitas ATPase serta tidak memerlukan S-adenosil metionin seperti pada enzim endonuklease restriksi tipe I. Salah satu contoh jenis enzim endonuklease restriksi tipe III adalah enzim *HgaI* yang mengenali urutan basa nukleotida 5'-GACGC-3', tetapi memotong DNA pada urutan basa kelima atau kesepuluh dari urutan yang dikenali tersebut. Enzim tipe ini sangat jarang digunakan dalam teknologi DNA rekombinan.

Nicholl (2002) mengatakan penggunaan enzim restriksi sangatlah mudah, hanya dengan mencampurkan larutan enzim secukupnya pada larutan DNA target dalam suatu larutan buffer dan diinkubasikan dalam suhu 37°C sudah bisa didapatkan pola fragment DNA. Aktivitas enzim dihitung dalam satuan unit, satu unit enzim dapat memotong 1 μ g DNA dalam waktu inkubasi 1 jam dengan suhu 37°C. Panjang fragmen DNA yang dihasilkan tergantung pada banyaknya frekuensi pengenalan sekuens enzim dengan sekuens DNA target. Sedangkan sisi pemotongan dari enzim restriksi menentukan tipe ujung fragmen DNA yang dihasilkan. Ada tiga jenis tipe ujung fragmen DNA yang mungkin terjadi proses pemotongan enzim restriksi yaitu (i) tipe ujung tumpul; (ii) tipe ujung fragmen yang menonjol pada ujung 3'; dan (iii) tipe ujung fragmen yang menonjol pada ujung 5'. Enzim restriksi *PstI* dan *EcoRI* membentuk pola 'sticky' ends pada fragmen DNAny. Pada enzim *PstI* pola 'sticky'nya menonjol pada ujung 3' sedangkan pada enzim *EcoRI* pola 'sticky'nya menonjol pada ujung 5'.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2006 sampai bulan Februari 2008, yang dilakukan di dua tempat, pengambilan sampel daun kedelai dan penanaman biji kedelai dilakukan di rumah kaca, Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Sedangkan untuk analisa DNANYa dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2. Bahan Tanaman dan Metode Penanaman

Pada penelitian ini digunakan 10 varietas tanaman kedelai jenis determinit, yang terdiri dari 5 varietas yang pasti bercabang dan 5 varietas yang belum diketahui tipe percabangannya. Varietas yang diketahui percabangannya terdiri dari varietas Anjasmoro, Argo mulyo, Burangrang, Sibayak, dan Tanggamus. Sedangkan 5 varietas yang belum diketahui tipe percabangannya meliputi Ijen, Panderman, Sinabung, Wilis, dan Kaba. Benih diperoleh dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian, Malang.

Masing-masing individu tanaman dari setiap varietas tersebut ditanam dalam 1 polybag berukuran 20 X10 X 10 cm³ yang berisi campuran tanah : tanah humus (1:1) yang memenuhi $\frac{3}{4}$ bagian polybag. Penanaman dilakukan dengan penambahan Furadan pada setiap lubang benih yang dibuat. Penambahan furadan dimasukkan untuk mencegah serangan jamur terhadap benih tanaman kedelai. Tanaman kedelai dipelihara di rumah kaca hingga tanaman berumur 2 bulan. Dari tanaman kedelai tersebut diambil daun mudanya untuk di isolasi DNANYa dan setelah berumur 2 bulan dilakukan pengukuran dan pengamatan pola percabangan.

3.3. Evaluasi pola pecabangan

Evaluasi pola percabangan kedelai dilakukan pada saat tanaman kedelai mencapai umur 2 bulan. Evaluasi dilakukan dengan menghitung jumlah cabang, mengukur panjang cabang fertilnya, dan menghitung jumlah nodus pada cabang.

3.4. Evaluasi Profil DNA dengan Metode RFLP

3.4.1. Isolasi DNA Tanaman Kedelai

Metode untuk isolasi DNA menggunakan metode CTAB (Doyle&Doyle, 1987). Daun muda dari pucuk tunas batang utama dan pucuk cabang tanaman kedelai diambil untuk diisolasi DNanya. Isolasi DNA menggunakan metode CTAB dimulai dengan menggerus daun muda kedelai sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan buffer ekstraksi dilanjutkan dengan inkubasi dalam waterbath pada suhu 65°C selama 30 menit. Homogenat yang didapat disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4°C, selama 10 menit, hingga terbentuk 2 lapisan larutan sampel. Diambil larutan lapisan paling atas untuk ditambahkan dengan larutan PCI (phenol, chloroform, dan isoamil alkohol) dengan volume sebanyak larutan sampel dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 13000 rpm dan suhu 4°C. Hasil sentrifugasi tersebut akan membentuk 3 lapis larutan, lapisan teratas diambil untuk ditambahkan larutan campuran chloroform dan isoamil alkohol (CI) dengan volume sama dengan larutan sampel yang didapat, dan dilakukan sentrifugasi kembali dengan suhu, kecepatan dan waktu yang sama hingga terbentuk 2 lapis larutan. Lapisan teratas diambil dan ditambahkan larutan amonium asetat 7.5 M yang diambil sebanyak 2.5 kali dari larutan sampel yang didapat dan juga dilakukan penambahan etanol absolut sebanyak 1/10 dari larutan sampel yang didapat. Campuran larutan diinkubasi pada suhu -20°C selama semalam. Hasil inkubasi membeku sehingga perlu di *thawing* agar bisa melanjutkan proses sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan dan suhu yang sama dengan sentrifugasi sebelumnya. Hasil sentrifugasi tersebut berupa pelet yang ditambahkan dengan 500 µL larutan etanol 70% yang disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan dan suhu yang sama dengan sentrifugasi sebelumnya. Dari proses sentrifugasi tersebut didapat hasil berupa pelet yang kemudian dikeringkan

repository.ub.ac

dalam inkubator selama ± 20 menit pada suhu 55°C dan ditambahkan dengan larutan TE (Tris-EDTA) buffer pH 7,6 dan untuk mendapatkan hasil yang maksimal disimpan pada suhu -20°C .

3.4.2. Perhitungan tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA dengan Spektrofotometer

Untuk menghitung tingkat kemurnian dan konsentrasi isolat DNA digunakan Spektrofotometer. Untuk menghitung konsentrasi dihitung dengan mengkalikan nilai Absorbansi larutan DNA pada panjang gelombang 260 nm dengan faktor pengenceran dari pelarut DNA dan OD 260 dari larutan DNA yang sama dengan satuan 1 mol sebanding dengan $50\ \mu\text{g/ml}$. Sedangkan tingkat kemurnian DNA dihitung dengan membandingkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Perbandingan nilai absorbansi 260 dengan nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm untuk mengetahui kadar kontaminan berupa protein.

Jika hasil penghitungan tersebut cukup bagus, maka hasil tersebut dapat langsung digunakan dalam proses pemotongan DNA (RFLP). Hasil penghitungan kemurnian dikatakan bagus, jika nilai penghitungan hasil perbandingan absorbansi panjang gelombang 260 nm dengan 280 nm berada pada kisaran 1,8 -2,0. Tetapi jika hasil yang didapatkan kurang dari 1,8 dan lebih dari 2 maka hasil isolasi DNA kurang memuaskan. Maka untuk memastikannya perlu dilakukan visualisasi DNA dengan elektroforesis agarosa. Hal ini diperlukan untuk memastikan utuh tidaknya untai DNA yang telah diisolasi sehingga siap untuk digunakan dalam metode pemotongan DNA (RFLP).

3.4.3. Pemotongan DNA dengan metode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Pemotongan DNA dalam penelitian ini menggunakan metode RFLP (Davidson, 2001). Proses pemotongan ini dimulai dengan memotong DNA hasil isolasi yang sudah dihitung secara kuantitatif dan kualitatif menggunakan 3 enzim restriksi yaitu *Eco* RI, *Bam* HI dan *Pst* I. Dalam metode ini dilakukan dengan menambahkan aquades steril ke dalam tabung eppendorf steril

dan menambahkan 10 x buffer enzim serta 10 U/ μ l enzim restriksi yang dicampurkan dengan penambahan \pm 1 μ g/ μ l larutan DNA sampel. Enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*. Campuran larutan tersebut dicampur dengan sistem pipeting, *mix by hand* dan dengan melakukan *spindown*. Untuk mengoptimalkan kerja enzim maka dilanjutkan dengan proses inkubasi yang dilakukan dalam *gene cycler*. Proses inkubasi ini dilakukan dengan 4 siklus yaitu siklus I dilakukan pada suhu 37°C selama 60 menit yang diulang sebanyak 3 siklus. Untuk masa inaktivasinya dilakukan pada siklus ke-4 yang dilaksanakan selama 20 menit dengan suhu yang berbeda tergantung dengan jenis enzim yang digunakan. Sampel DNA yang dipotong dengan enzim *EcoRI* diinaktivasi pada suhu 65°C, sedangkan untuk sampel DNA yang dipotong dengan enzim *PstI* dan *BamHI* diinaktivasi pada suhu 80°C. Hasil pemotongan DNA dengan metode RFLP ini divisualisasikan dengan elektroforesis agarose 2%.

3.4.4. Visualisasi DNA hasil pemotongan enzim restriksi dengan Elektroforesis Agarose 2%

Untuk melihat hasil pemotongan DNA dengan metode RFLP maka perlu dilakukan visualisasi DNA melalui elektroforesis agarose 2%. Suspensi DNA hasil pemotongan enzim restriksi dari masing-masing sampel diambil sebanyak 3 μ L dan dicampurkan dengan 2 μ L *Loading dye*. Campuran tersebut kemudian dimasukkan kedalam sumuran gel agarose 2% yang berbeda. Gel yang telah dimasukkan sampel kemudian dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama \pm 1 jam. Gel bersama sampel hasil elektroforesis divisualisasikan dengan UV transiluminator.

3.5. Analisis Data

Masing-masing ukuran jumlah cabang, panjang cabang, dan jumlah nodus cabang dengan setiap panjang fragmen dari pola restriksi DNA kedelai hasil pemotongan enzim *EcoRI*, *BamHI* dan *PstI* dianalisa secara kuantitatif. Analisa kuantitatif yang dilakukan untuk menganalisis kekerabatan 10 varietas kedelai menggunakan program *clad97* (Rahardi, 2002).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Percabangan 10 varietas tanaman Kedelai

Hasil pengamatan morfologi percabangan menunjukkan jumlah cabang 10 varietas tanaman kedelai berkisar antara 1-4 cabang (Tabel 4.1). Sehingga tanaman kedelai yang memiliki rata-rata jumlah cabang ≥ 3 dikelompokkan menjadi tanaman bercabang banyak. Sedangkan tanaman kedelai yang memiliki rata-rata jumlah cabang 1-2 dikelompokkan menjadi tanaman bercabang sedikit. Varietas yang termasuk dalam kelompok tanaman kedelai bercabang banyak adalah Burangrang, Panderman, Sibayak, Ijen, Kaba, Tanggamus dan Wilis. Varietas yang termasuk dalam kelompok tanaman kedelai bercabang sedikit adalah Anjasmoro, Argomulyo dan Sinabung. Kedelai yang bercabang banyak dan kedelai yang bercabang sedikit ditunjukkan pada Gambar 4.1. Sedangkan panjang cabang 10 varietas tanaman kedelai berkisar antara 10-40 cm. Sedangkan untuk jumlah nodus cabangnya yaitu antara 2-5 nodus cabang, hal ini ditunjukkan pada Tabel 4.1. Kondisi lingkungan penanaman dalam penelitian ini diduga menyebabkan pembentukan cabang tidak maksimum. Jarak tanam yang kurang memadai menjadi salah satu faktor penghambat pembentukan cabang tanaman kedelai pada penelitian ini. Penanaman kedelai pada penelitian ini dilakukan dengan jarak tanam $\pm 3-5$ cm antar individu. Sedangkan untuk penanaman kedelai membutuhkan jarak tanam ± 15 cm untuk setiap individunya.

Pengelompokkan 10 varietas Kedelai dalam penelitian ini berbeda dengan Suhartina (2005) yang mengatakan bahwa varietas Burangrang merupakan varietas kedelai bercabang sedikit yang memiliki 1-2 cabang. Sedangkan varietas Argomulyo dan Anjasmoro merupakan varietas kedelai bercabang banyak yang masing-masing memiliki 3-4 cabang. Suprpto (1992) menginformasikan, jarak tanam yang terlalu rapat dapat mempengaruhi pembentukan cabang. Hal ini disebabkan oleh pertambahan panjang dari tunas lateral yang terhambat oleh sempitnya ruang tumbuh cabang. Sehingga pertumbuhan tunas lateral terhambat dan tidak dapat membentuk

cabang. Damascos dkk (2005) menambahkan, tanaman kedelai membutuhkan jarak tanam ± 15 cm antar individu untuk pembentukan cabang yang sempurna.

Tabel.4.1.Hasil pengamatan deskripsi percabangan pada tanam kedelai berdasarkan hasil penelitian

Varietas	Rerata ΣC	Rerata PC (cm)	Rerata ΣNC	Keterangan
Anjasmoro	1	10	3	C.Sedikit
Argo mulyo	2	20	4	C.Sedikit
Burangrang	3	30	4	C.Banyak
Panderman	3	20	2	C.Banyak
Sibayak	4	40	5	C.Banyak
Ijen	3	30	4	C.Banyak
Kaba	3	30	4	C.Banyak
Sinabung	1	20	3	C.Sedikit
Tanggamus	3	20	4	C.Banyak
Wilis	3	20	3	C.Banyak

Ket. ΣNC = Jumlah nodus pada cabang; PC = Panjang cabang; ΣC = Jumlah Cabang



(a)

(b)

Gambar 4.1. Percabangan pada tanaman kedelai (a) Varietas Kaba yang mewakili kedelai bercabang banyak dan (b) Varietas Argomulyo yang mewakili kedelai bercabang sedikit.

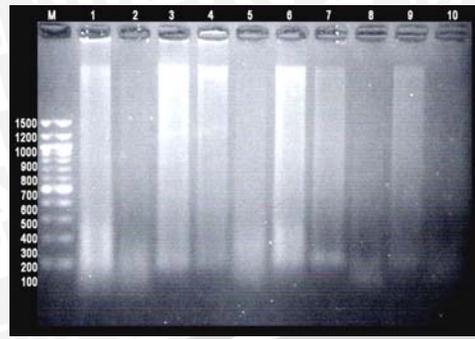
Capon (2005) mengatakan, faktor-faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi proses pembentukan cabang pada suatu tanaman adalah sinar matahari, sistem pengairan, kadar pemupukan, pertumbuhan mikroorganisme patogenik disekitar lokasi penanaman, dan jarak penanaman antar individu tanaman. Prithiviraj dkk, (2007) menambahkan, mikroorganisme patogen yang berada disekitar lokasi penanaman dapat menyebabkan tunas calon cabang membusuk.

Menurut Salisbury dan Ross (1992), intensitas cahaya matahari yang cukup tinggi juga dapat merangsang hormon auksin untuk bergerak kearah jaringan meristem aksilar sehingga dapat menginisiasi pembentukan cabang.

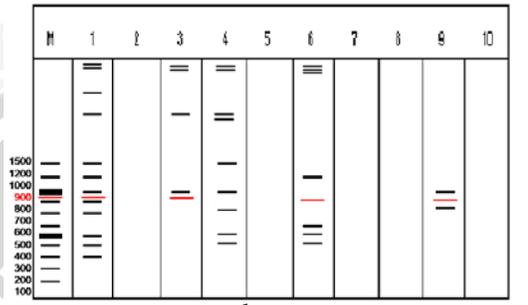
Pola adaptasi tanaman terhadap suatu perubahan lingkungan yang terlalu ekstrim juga dapat mempengaruhi pola percabangan. Mohr dan Schopfer (1995) mengatakan, jika suatu tanaman diletakkan pada lingkungan yang kering maka tanaman akan melakukan perubahan morfologi dan fisiologi. Salah satu perubahan morfologi yang dilakukan adalah mengurangi pembentukan cabang untuk mengurangi penguapan. Sedangkan menurut Machikowa dkk (2004), kadar unsur esensial dalam tanah juga dapat mempengaruhi struktur morfologi tanaman. Jika kadar unsur esensial dalam tanah sangat terbatas, maka dapat digantikan oleh pemberian pupuk. Penambahan kadar pupuk yang diberikan pada lahan tanam diiringi oleh penambahan pembentukan cabang.

4.2. Profil pita restriksi DNA kedelai hasil pemotongan 3 Enzim dengan teknik RFLP

Hasil pemotongan dengan 3 enzim restriksi pada DNA 10 varietas tanaman kedelai menunjukkan pola yang sangat berbeda. Pada pola restriksi enzim *Bam*HI dan *Pst*I terbentuk sejumlah fragmen yang cukup banyak. Sedangkan jumlah fragmen yang dibentuk oleh enzim *Eco*RI lebih sedikit. Sebagian besar fragmen DNA dari 10 varietas tanaman kedelai hasil pemotongan 3 enzim memiliki panjang fragmen yang berbeda, namun sebagian fragmen DNA memiliki panjang fragmen yang sama.



a



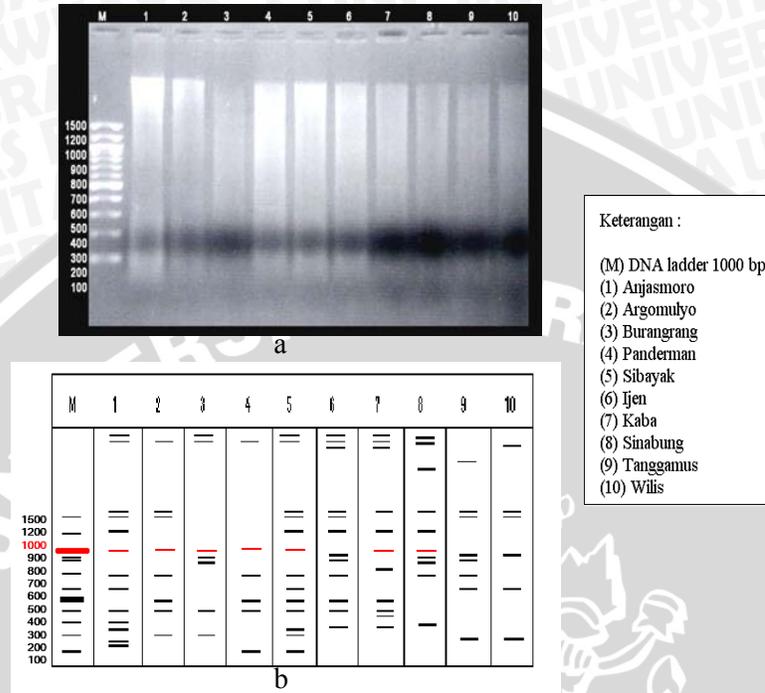
b

- Keterangan :
- (M) DNA ladder 1000 bp
 - (1) Anjasmoro
 - (2) Argomulyo
 - (3) Burangrang
 - (4) Panderman
 - (5) Sibayak
 - (6) Ijen
 - (7) Kaba
 - (8) Sinabung
 - (9) Tanggamus
 - (10) Wilis

Gambar 4.2. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim *EcoRI*

Hasil pemotongan enzim *EcoRI* hanya dapat ditemukan pada sampel DNA 5 varietas tanaman kedelai yaitu varietas Anjasmoro, Burangrang, Panderman, Ijen, dan Tanggamus (Gambar 4.2.). Jumlah fragmen terbanyak dimiliki oleh varietas Anjasmoro yaitu 9 fragmen DNA. Sedangkan untuk jumlah fragmen yang paling sedikit dimiliki oleh varietas Burangrang yaitu sebanyak 2 fragmen DNA. Panjang fragmen DNA yang dihasilkan oleh enzim *EcoRI* berkisar antara 300 Pb-1500 Pb. Fragmen DNA dengan panjang 900 Pb selalu ditemukan pada pola restriksi varietas Anjasmoro, Burangrang, Ijen dan Tanggamus. Hampir semua varietas tersebut termasuk dalam kelompok tanaman bercabang banyak, namun hanya varietas Anjasmoro yang tidak memiliki cabang banyak. Secara genetis varietas Anjasmoro memiliki kesamaan sifat dengan varietas

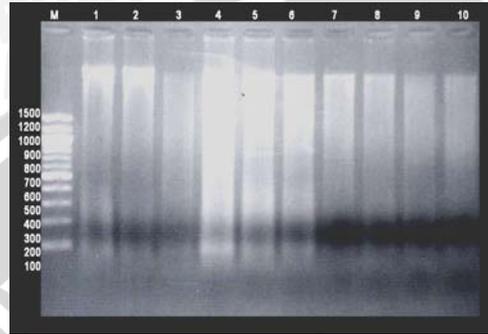
Burangrang, Ijen, dan Tanggamus. Hal ini dapat terjadi diduga karena terhambatnya ekspresi gen percabangan pada varietas Anjasmoro oleh kondisi lingkungan penanaman yang kurang mendukung. Karakter percabangan merupakan salah satu karakter yang bersifat kuantitatif yang dalam pembentukannya lebih banyak dipengaruhi oleh lingkungan.



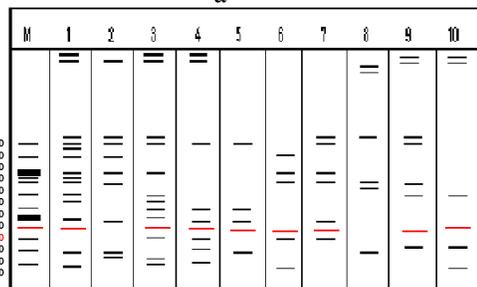
Gambar 4.3. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim *Bam*HI

Enzim *Bam*HI dapat memotong sampel DNA pada semua varietas tanaman kedelai (Gambar 4.3). Hampir semua varietas memiliki jumlah fragmen DNA yang cukup banyak yaitu lebih dari 5 fragmen. Hanya 1 varietas yang memiliki jumlah fragmen DNA paling sedikit yaitu varietas Wilis yang memiliki 4 fragmen. Sedangkan fragmen terbanyak yaitu 9 fragmen DNA dimiliki oleh varietas Sibayak. Enzim *Bam*HI menghasilkan beberapa fragmen DNA dengan panjang fragmen berkisar antara

100 Pb-1500 Pb. Namun hanya fragmen DNA dengan panjang fragmen 1000 Pb yang selalu terbentuk pada sebagian besar varietas tanaman kedelai bercabang banyak. Varietas tanaman kedelai yang memiliki fragmen tersebut adalah varietas Anjasmoro, Argomulyo, Burangrang, Panderman, Sibayak, Kaba, dan Sinabung. Adapun varietas yang memiliki cabang sedikit namun juga memiliki fragmen tersebut yaitu varietas Anjasmoro dan Argomulyo. Hal ini dapat terjadi karena adanya faktor lingkungan yang menghambat pembentukan cabang pada varietas tersebut.



- Keterangan :
- (M) DNA ladder 1000 bp
 - (1) Anjasmoro
 - (2) Argomulyo
 - (3) Burangrang
 - (4) Panderman
 - (5) Sibayak
 - (6) Ijen
 - (7) Kaba
 - (8) Sinabung
 - (9) Tanggamus
 - (10) Wilis



Gambar 4.4. Visualisasi (a) dan diagram skematis (b) pola restriksi DNA Kedelai oleh enzim *PstI*

Seperti halnya enzim *BamHI*, enzim *PstI* juga dapat memotong sampel DNA pada semua varietas kedelai. Enzim *PstI* dapat menghasilkan fragmen DNA lebih banyak dibandingkan dengan jumlah fragmen yang dihasilkan oleh enzim *BamHI* dan

EcoRI (Gambar 4.4). Jumlah fragmen terbanyak yang dihasilkan oleh enzim *PstI* adalah 10 fragmen terdapat pada varietas Anjasmoro. Sedangkan untuk jumlah fragmen paling sedikit yang dihasilkan oleh enzim *PstI* adalah 2 fragmen DNA dimiliki oleh varietas Sinabung. Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan oleh *PstI* berkisar antara 100Pb – 1500 Pb. Fragmen DNA yang berukuran 1500 Pb, 800 Pb, 500 Pb dan 400 Pb ditemukan pada varietas Anjasmoro dan Argomulyo. Sedangkan pada varietas Anjasmoro, Burangrang, Panderman, Sibayak, Ijen, Kaba, Tanggamus dan Wilis selalu ditemukan fragmen DNA yang berukuran 400 Pb. Varietas-varietas tanaman kedelai tersebut merupakan tanaman kedelai bercabang banyak kecuali varietas Anjasmoro. Fragmen DNA yang berukuran 400 Pb diduga berkaitan dengan sifat cabang banyak pada tanaman kedelai. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi adanya keterkaitan fragmen tersebut dengan gen percabangan. Sedangkan pada fragmen DNA berukuran 1500 Pb, 800 Pb, dan 500 Pb diduga berkaitan dengan sifat cabang sedikit.

Pita-pita DNA hasil pemotongan dari ketiga enzim (*EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*) tampak sangat tipis hal ini mungkin disebabkan adanya kontaminasi oleh polisakarida, fenol atau protein, dan RNA pada hasil isolasi DNA (lampiran 6). Sedangkan fragmen DNA tertentu pada setiap pola restriksi dari 3 enzim selain dimiliki oleh varietas bercabang banyak, namun juga dimiliki oleh varietas yang bercabang sedikit. Hal ini mungkin disebabkan gen percabangan yang mungkin terdapat pada fragmen tersebut tidak terekspresi. Karena kondisi lingkungan dapat mempengaruhi ekspresi suatu gen percabangan.

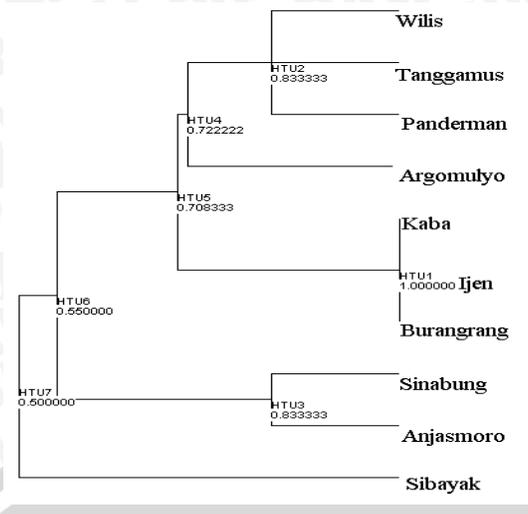
Suhartina (2005) menerangkan, varietas Anjasmoro dan Argomulyo merupakan tanaman bercabang banyak. Namun pada penelitian ini kedua varietas tersebut hanya memiliki sedikit cabang dan memiliki satu fragmen seperti tanaman bercabang banyak. Menurut Schopfer dan Mohr (1995), hal ini dapat terjadi karena penambahan dan pengurangan jumlah cabang pada tanaman kedelai merupakan usaha adaptasi tanaman terhadap lingkungan melalui perubahan ekspresi gen yang diikuti oleh perubahan struktur morfologi cabang.

Suryanto (2003) menjelaskan, polimorfisme DNA dapat dideteksi keragaman genetiknya melalui teknik RAPD dan RFLP. Powers dan Szalanski, (2005) menambahkan, RFLP merupakan studi yang paling sesuai pada tingkat intraspesifik atau diantara taksa yang memiliki hubungan erat. Perbedaan fragmen DNA dari masing-masing varietas pada pola restriksi 3 enzim *Bam*HI, *Eco*RI, dan *Pst*I digunakan untuk mengidentifikasi spesies atau varietas. Sehingga teknik RFLP dapat digunakan sebagai langkah awal penentuan hubungan kekerabatan antar individu dalam satu spesies berdasarkan komposisi genetiknya.

Analisis kekerabatan secara fenetik dapat dilakukan berdasarkan pola restriksi sampel DNA. Karena menurut Brooker (1999), pemotongan sampel DNA dengan beberapa enzim restriksi yang berbeda dapat digunakan untuk mengetahui polimorfisme dari DNA total. Kimball (2004) menambahkan bahwa polimorfisme merupakan perbedaan yang diturunkan dalam individu disuatu populasi. Analisis polimorfisme dapat digunakan untuk pengujian tingkat keragaman genetik dalam suatu populasi. Maka pola restriksi DNA hasil pemotongan enzim restriksi dapat digunakan sebagai dasar pembuatan fenogram kekerabatan.

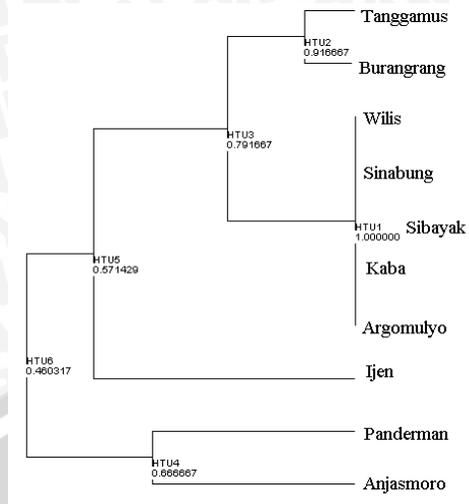
4.3. Hubungan kekerabatan antara 10 varietas kedelai berdasarkan pola morfologi cabang dan pola restriksi DNA

Hubungan kekerabatan antara 10 varietas tanaman kedelai dijelaskan oleh empat fenogram yang dibuat berdasarkan data morfologi percabangan, pola restriksi enzim *Eco*RI, pola restriksi enzim *Bam*HI, pola restriksi enzim *Pst*I dan gabungan pola restriksi 3 enzim berbeda (*Eco*RI, *Bam*HI, *Pst*I). Fenogram-fenogram tersebut menunjukkan pola hubungan kekerabatan yang sangat bervariasi.



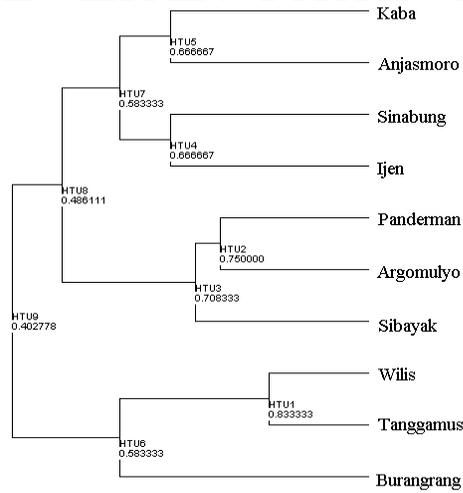
Gambar 4.5. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan morfologi cabang (jumlah cabang, panjang cabang dan jumlah nodus pada cabang).

Berdasarkan fenogram morfologi percabangan 10 varietas tanaman kedelai (Gambar 4.5), tampak varietas Argomulyo berkerabat dengan varietas Tanggamus, Wilis dan Panderman dengan nilai koefisien kesamaan sebesar 0.72. Varietas Argomulyo termasuk varietas bercabang sedikit sedangkan varietas Tanggamus, Wilis serta Panderman merupakan tanaman bercabang banyak. Argomulyo dapat berkerabat dengan Wilis, Tanggamus dan Panderman karena memiliki panjang cabang yang sama. Disamping itu varietas Sinabung juga memiliki ukuran panjang yang sama dengan 4 varietas tersebut. Namun karena memiliki jumlah cabang dan jumlah nodus cabang yang berbeda, maka varietas Sinabung berkerabat cukup jauh dengan 4 varietas tersebut. Varietas Sinabung berkerabat cukup dekat dengan varietas Anjsamoro karena memiliki jumlah cabang dan jumlah nodus pada cabang yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan 10 varietas kedelai tidak selalu dipengaruhi oleh jumlah cabang. Ada faktor percabangan lain yang turut mempengaruhi kekerabatan 10 varietas kedelai, yaitu panjang cabang dan jumlah nodus pada cabang.



Gambar 4.6. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim *EcoRI*

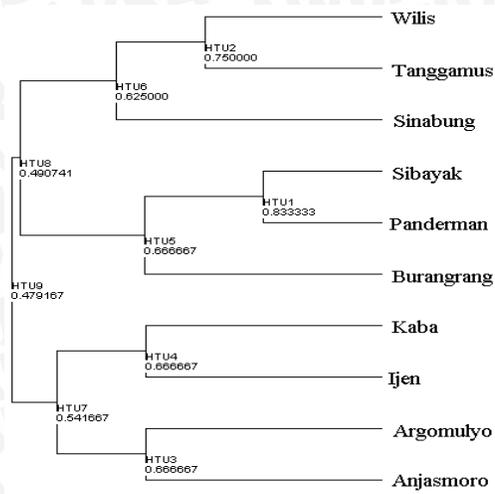
Berdasarkan pola restriksi enzim *EcoRI* (Gambar 4.6) secara genetik varietas Wilis, Sinabung, Sibayak, Kaba dan Argomulyo memiliki kesamaan sifat, karena enzim *EcoRI* tidak dapat memotong DNA dari 5 varietas tersebut. Namun berdasarkan morfologi cabang 5 varietas tersebut saling berbeda satu sama lain. Varietas Wilis, Sibayak dan Kaba termasuk kelompok tanaman kedelai bercabang banyak. Sedangkan varietas Sinabung dan Argomulyo termasuk kelompok tanaman kedelai bercabang sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan lebih mempengaruhi pembentukan karakter percabangan pada 5 varietas tersebut. Meskipun sudah seharusnya faktor lingkungan berkerja sama dengan faktor genetik dalam penentuan karakter percabangan. Namun terkadang pengaruh faktor lingkungan lebih mendominasi dalam penentuan karakter percabangan.



Gambar 4.7. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim *Bam*HI

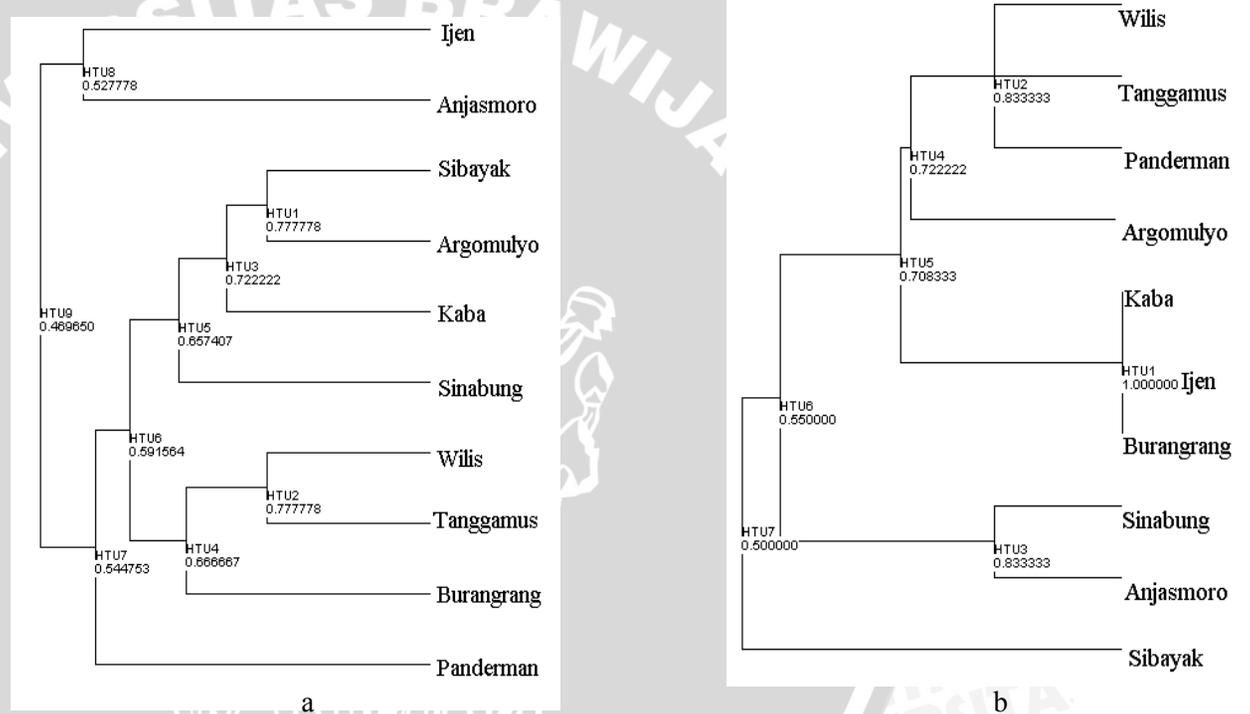
Fenogram pola restriksi enzim *Bam*HI menunjukkan bahwa varietas Panderman masih berkerabat dengan Argomulyo yang memiliki nilai koefisien kesamaan 0.75, dimana kedua varietas tersebut memiliki jumlah cabang yang berbeda. Namun hubungan terdekat dimiliki oleh varietas Wilis dan Tanggamus dengan nilai koefisien kesamaan sebesar 0.83. Kedua varietas tersebut memiliki jumlah cabang yang sama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah cabang tidak selalu mempengaruhi hubungan kekerabatan pada 10 varietas tanaman kedelai.





Gambar 4.8. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi enzim *PstI*

Berdasarkan fenogram pola restriksi hasil pemotongan enzim *PstI*, menunjukkan varietas Sinabung yang bercabang sedikit masih berkerabat dengan varietas Wilis dan Tanggamus yang bercabang banyak. Hal ini dapat terjadi karena varietas Sinabung memiliki jumlah fragmen yang sama dengan varietas Wilis dan Tanggamus yaitu kurang dari 5 fragmen. Berbeda dengan varietas Argomulyo dan Anjasmoro yang memiliki jumlah fragmen lebih dari 5 fragmen. Sehingga varietas Anjasmoro dan Argomulyo berkerabat jauh dengan varietas Sinabung, Wilis dan Tanggamus. Hal ini menunjukkan bahwa genotip tidak selalu tercermin pada fenotip. Terkadang pengaruh faktor lingkungan lebih mendominasi dalam penentuan fenotip. Walaupun fenotip tidak dapat melewati kemampuan genotip dalam penentuan karakter percabangan. Karakter percabangan merupakan karakter kuantitatif yang pembentukannya sangat mudah dipengaruhi oleh lingkungan.



Gambar 4.9. Hubungan kekerabatan 10 varietas Kedelai berdasarkan pola restriksi gabungan 3 enzim (a) dan berdasarkan morfologi cabang (b)

Semua hasil analisis kekerabatan berdasarkan peta restriksi hasil pemotongan 3 enzim kemudian digabungkan menjadi 1 fenogram yang kemudian dibandingkan dengan fenogram berdasarkan morfologi cabang. Berdasarkan fenogram gabungan pola restriksi 3 enzim (Gambar 4.9.a) menunjukkan varietas Sibayak yang bercabang banyak masih berkerabat dengan varietas Argomulyo yang bercabang sedikit. Sedangkan berdasarkan fenogram morfologi cabang (Gambar 4.9.b), dimana varietas Argomulyo yang bercabang sedikit berkerabat cukup jauh dengan varietas Sibayak yang bercabang banyak. Secara genetik varietas Argomulyo dengan varietas Sibayak berkerabat cukup dekat. Sedangkan berdasarkan morfologi percabangannya hubungan kekerabatan varietas Argomulyo berjauhan dengan varietas Sibayak. Morfologi percabangan merupakan hasil kerja sama antara faktor genotip dan faktor lingkungan. Ekspresi gen percabangan dipengaruhi oleh lingkungan. Jika kondisi lingkungan penanaman mendukung untuk pembentukan cabang, maka cabang akan terbentuk maksimal. Begitu pun sebaliknya jika kondisi lingkungan penanaman kurang mendukung dalam proses pembentukan cabang, maka cabang tidak terbentuk maksimal. Sehingga dapat disimpulkan faktor lingkungan lebih mendominasi dalam mempengaruhi pembentukan cabang pada tanaman kedelai dibandingkan dengan faktor genetisnya.

Schopfer dan Mohr (1995) menerangkan, tidak terekspresinya gen yang diikuti oleh perubahan struktur morfologi cabang merupakan akibat dari usaha adaptasi tanaman terhadap lingkungan.

Radford (1986) menjelaskan, apabila semakin banyak persamaan ciri yang dimiliki maka dapat dikatakan hubungan kekerabatannya semakin dekat dan bila semakin sedikit persamaan ciri yang dimiliki maka semakin jauh hubungan kekerabatannya. Menurut Saupe (2007), hubungan fenetik antar taxa dari suatu individu merupakan suatu hubungan persamaan. Dimana suatu individu dari berbagai macam taxa dikelompokkan berdasarkan kesamaan dan ketidaksamaannya. Semakin besar nilai koefisien kesamaannya semakin dekat hubungan kekerabatannya.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Jumlah fragmen DNA hasil pemotongan enzim *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI* tidak terkait dengan jumlah cabang pada 10 varietas tanaman kedelai. Hanya fragmen DNA dengan panjang fragmen tertentu yang dapat mempengaruhi jumlah cabang pada 10 varietas tanaman kedelai. Setiap pola restriksi hasil pemotongan 3 enzim memiliki 1 fragmen DNA dengan ukuran panjang fragmen yang berbeda. Pola restriksi enzim *EcoRI* memiliki panjang fragmen berukuran 900 Pb, pola restriksi enzim *BamHI* memiliki panjang fragmen berukuran 1000 Pb, dan pola restriksi enzim *PstI* memiliki panjang fragmen berukuran 400 Pb. Fragmen tersebut dimiliki oleh sebagian besar varietas kedelai bercabang banyak.

Hubungan kekerabatan 10 varietas tanaman kedelai, berdasarkan morfologi percabangan tidak selalu dipengaruhi oleh jumlah cabang. Selain jumlah cabang faktor lain yang turut mempengaruhi kekerabatan 10 varietas kedelai yaitu panjang cabang dan jumlah nodus pada cabang. Kekerabatan 10 varietas kedelai berdasarkan morfologi percabangan berbeda dengan kekerabatan berdasarkan gabungan pola restriksi 3 enzim. Hal ini mungkin disebabkan oleh terhambatnya ekspresi gen percabangan karena pengaruh kondisi lingkungan.

5.2. Saran

Perlu dilakukan pemurnian sampel DNA total untuk mendapatkan pola restriksi DNA yang lebih jelas. Serta perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memetakan gen percabangan dari fragmen-fragmen DNA dari 10 varietas tanaman kedelai hasil pemotongan enzim restriksi *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, R. L. P., J. T. Knowle, dan D. P. Leader. 1992. **The Biochemistry of The Nucleic Acid. 11th Edition.** Chapman dan Hall Publishing. London. Hal : 117-120.
- Arumingtyas, EL. 2006. **Induksi Mutasi Dengan Mutagen Ethyl Methane Sulfonate (EMS) untuk Menghasilkan Percabangan Pada Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L).** Disertasi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Asianto, Y. M., 1978. **Wilayah Kesesuaian Berdasarkan Iklim untuk Tanaman Kedelai, Jagung dan Ubi Kayu di Pulau Lombok.** Skripsi. Jurusan Geografi FMIPA UI. 1978. Depok
- Baharsjah, J.S., D. Suardi, dan I. Las. 1993. **Hubungan Iklim dengan Pertumbuhan Kedelai.** Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. Hal 87-102.
- Barros, E. G., S. Tingey dan J. A. Rafalski. 2000. **Sequence Characterization of Hypervariable Regions in The Soybean Genome : Leusine-Rich Repeats and Simple Sequence Repeats.** Genetic and Molecular Biology, 23, 2. 411-415.
- Benson, L. 1957. **Plant Classification.** D.C. Heat and Co. Boston. P.688
- Brooker, R. J. 1999. **Genetics Analysis and Principles.** Benjamin Cummings. Addison Wesley. Longman. Inc. California. Hal.454.
- Capon, B. 2005. **Botany For Gardeners Revised Edition.** Timber Press. Oregon. P.89,143-144.

- Davidson, NC. 2001. **RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism**. <http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/method/RFLP.html#mapping>. di akses tanggal 26 Februari 2006.
- Doyle, J. J. dan J. L. Doyle. 1987. **A Rapid DNA Isolation Procedure From Small Quantities of Fresh Leaf Tissues**. *Phytochem Bull.* 19 : 11-15.
- Damascos. M. A., C.H.B.A. Prado dan C.C. Ronquim. 2005. **Bud Composition, Branching Patterns and Leaf Penology in Cerrado Woody Species**. *Annals of Botany. Brasil* 96 : 1075-1084.
- Eckardt, N. 2006. **The Evolution Of Food Plants: Genetic Control Of Grass Flower Architecture - Ramosa2 Determines Cell Fate In Branch Meristems Of Maize**. *American Society of Plant Biologists*. Article. Sussex.
- Fagi, A. M. dan F. Tangkuman. 1985. **Pengelolaan Air untuk Pertanaman Kedelai**. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Sukamandi.
- Glick, B. dan J. J. Pasternak. 1998. **Molecular Biology : Principles and Application or Recombinant DNA**. American Society for Microbiology. Washington DC. Pp: 62-68.
- Grodziker, T., J. William., P. Sharp dan J. Sambrook. 1974. **Physical Mapping of Temperature Sensitive Mutation of Adenovirus**. *Cold Spring Harbor Symp quant Biol.* 39:508-513.
- Hill, W. 2006. **Fragment Length Polymorphism (RFLP)**. <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/rflp.html:Restriction>. Diakses tanggal 10 februari 2006.
- Karakaya, H.C., Y. Tang., P.B. Cregan., dan H.T. Knap. 2002. **Molecular Mapping of The Fasciation Mutation in**

Soybean, *Glycine max* (Leguminosae). Clemson University. Maryland. USA. 89 (4) : 559-565.

Keshun, L. 1997. **Soybean, Chemistry, Technology, and Utilization.** Chapman and Hall. New York. Hal 532.

Kimball, J. W. 2004. **Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs).** <http://www.users.rcn.com/Jkimball.ma.ultranet/Biology/Pages/R/RFLPs.htm>. tanggal akses 15 juni 2007.

Machikowa, T., A. Waranyuat, P. Laosuwan. 2004. **Relationships Between Seed Yield and Other Character of Different Maturity Types of Soybean Grown in Different Environment and Levels of Fertilizers.** Research Article Thailand. Science Asia 31:(2005)37-41.

Macampbell. 2001. **RFLP Method-Restriction Fragment Length Polymorphism.** Department of Biology. Davidson College. New York.

Martin, J.H., W.H.Leonard, dan D.L.Stamp.1967. **Principles of Field Crop Production.** Macmillan Publ.Co.,Inc. New York. Pp.691-713

Nicholl, P. S. T. 2002. **An Introduction to Genetic Engineering Second Edition.** Cambridge University Press. Cambridge. Page 43-44.

Powers, T., dan A. Szalanzki. 2005. **Restriction Fragment Length Polimorphism (RFLP).** http://nematode.uml.edu/its_d/pcr_rflp.htm. Diakses tanggal 16 Juni 2006.

Progressio Indonesia. 2003. **Kedelai.** <http://warintek.progresio.or.id/pertanian/kedelai.htm>. Diakses tanggal 18 Februari 2008.

- Radford, A.E. 1986. **Fundamental of Plant Systematic**. Harper and Row Publisher. Inc. New York.
- Rahardi, B. 2002. **Pemrograman Aplikasi Konstruksi Kekerabatan Taksonomi dengan Visual C++ 6.0**. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang.
- Ray Anna C. 1992. **Dasar-dasar Genetika** edisi 2. Penerjemah Apandi Muchidin. Penerbit Erlangga. Jakarta. Hal 224-225, 298-305.
- Rbowen. 2000. **Restriction Mapping**. [http:// www. vivo. colostate. edu/ hbooks/ genetics/biotech/enzymes/maps.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/maps.html). tanggal akses 10 Februari 2006.
- Rosenzweig, V.E., D.V. Goloenko, O.G. Davydenko dan O.V. Shablinskaya. 2003. **Short Communication Breeding strategies for early soybeans in Belarus**. *Soya-North Co. Ltd.* Plant Breeding, 122 (5): 456-458.
- Rozari dan Muharwan. 1986. **Klimatologi Dasar**. Jurusan Geofisika dan Metereologi FMIPA IPB. Bogor.
- Rukmana, R. 1996. **Kedelai, Budidaya dan Pasca Panen**. Kanisius. Yogyakarta. hal 92.
- Sakino, N. 1992. **Penanaman Kedelai**. Japan Cooperation Agency. Jepang. Hal 24.
- Salisbury, F. B., C. W. Ross. 1992. **Fisiologi Tumbuhan Jilid 3 Perkembangan Tumbuhan dan Fisiologi Lingkungan**. Edisi keempat. Alih Bahasa. Dr. Diah. R. Lukman dan Ir. Sumaryono. Msc. Penerbit ITB. Bandung. Hal.46.

- Saupe, S. G. 2007. **Phenetic Classification Systems**. Plant Taxonomy (Biol 308). St.John's university. Collegeville.Manchester.
- Schopfer, P dan H. Mohr. 1995. **Plant Physiology**. Springer. Hongkong.
- Sofro, A.S.M. 1994. **Keanekaragaman Genetik**. Penerbit Andi offset. Yogyakarta. Hal 1-14.
- Somaatmadja, S. 1993. **Prosea Sumber Daya Nabati Asia Tenggara 1 'Kacang-kacangan'**. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 43-51.
- Sumarno. 1993. **Teknik Pemuliaan Kedelai**. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor. Hal 263-264
- Sumarno dan Harnoto. 1983. **Kedelai dan Cara Bercocok Tanam**. Buletin Teknik. Bogor. Hal 1-35.
- Suhartina. 2005. **Deskripsi Varietas Unggul Kacang-kacangan dan Umbi-umbian**. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Malang. Hal 2-63.
- Suprpto, H. S. 1992. **Bertanam Kedelai**. Penebar Swadaya. Jakarta. Russel, P.,J. 1992. Genetic 3rd edition. Harper Collins Publisher. New York. Hal 74.
- Suprpto. 2002. **Bertanam Kedelai**. Penebar Swadaya. Jakarta. Hal 74.
- Suryanto, D. 2003. **Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler**. <http://www.library.usu.ac.id/module.php?op=modload&name=Downloads&file=index®=getit&Iid=388>. tanggal akses 16 Juni 2007.

Tamarin, R. H. 2002. **Principles of Genetics**. 7th edition. Mc Graw Hill. New York. Hal 212-217,378.

Tjitrosoepomo, G. 2000. **Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 477.

Yuwono, T. 2005. **Biologi Molekuler**. Erlangga. Jakarta. Hal 39.



Lampiran 1. Bahan-bahan yang diperlukan dalam Isolasi DNA**Tabel 1. Komposisi Buffer Ekstraksi CTAB**

Bahan	Konsentrasi Akhir
CTAB	0,02 g/ml
Tris 1M, pH 8	0,1 M
EDTA 0.5 M, pH 8	0,02 M
NaCl 5 M	1,4 M
dH ₂ O	56 %
B-merkaptotanol	2 %

Tabel 2. Komposisi Phenol-Chloroform-Isoamilalkohol / PCI (50 ml)

Bahan	Volume (ml)
Phenol cair	25
Chloroform	24
Isoamil alkohol	1

Tabel 3. Komposisi Chloroform-Isoamilalkohol / CI (25 mL)

Bahan	Volume (ml)
Chloroform	24
Isoamil alkohol	1

Tabel 4. Komposisi Tris EDTA buffer / TE buffer pH 7,6

Bahan	Konsentrasi Akhir
Tris-Cl 10 mM	0,012 g/ml
EDTA 1 mM	$3,72 \cdot 10^{-4}$ g/ml

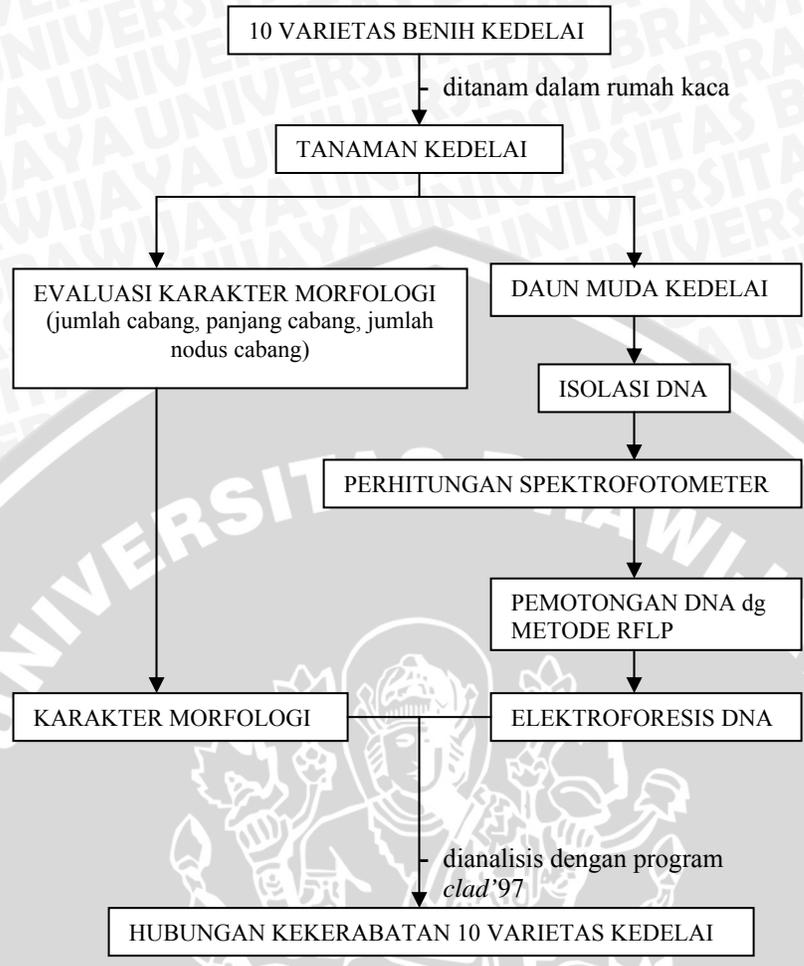
Tabel 5. Komposisi Tris Borat EDTA / TBE buffer

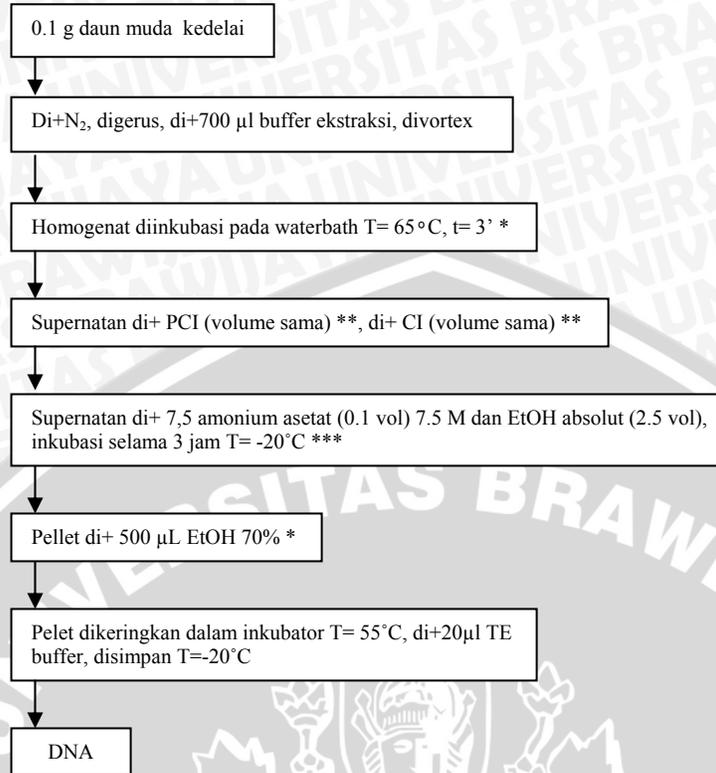
Bahan	Konsentrasi Akhir
Tris-Cl 1 M	0,061 g/ml
Boric acid 1 M	0,031 g/ml
Na ₂ EDTA 20 mM	0,004 g/ml

Tabel 6. Komposisi Loading dye (1 mL)

Bahan	Konsentrasi Akhir
50 % Glycerol	57,47 %
1 mM EDTA	0,002 mM
0,4% Bromophenol Blue	0,004 g/ml
dH ₂ O	Sampai 1 ml

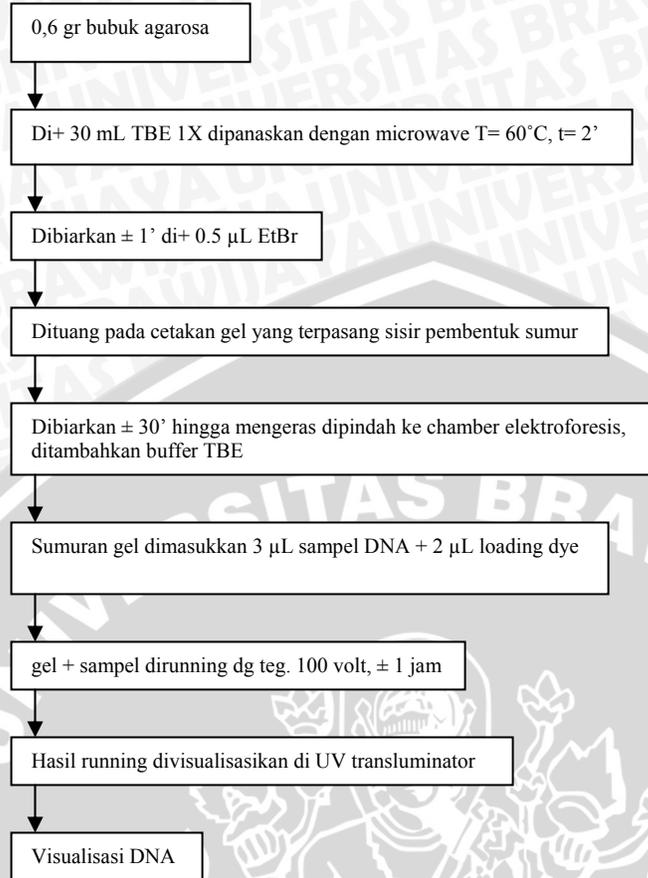
Lampiran 2. Rancangan Penelitian



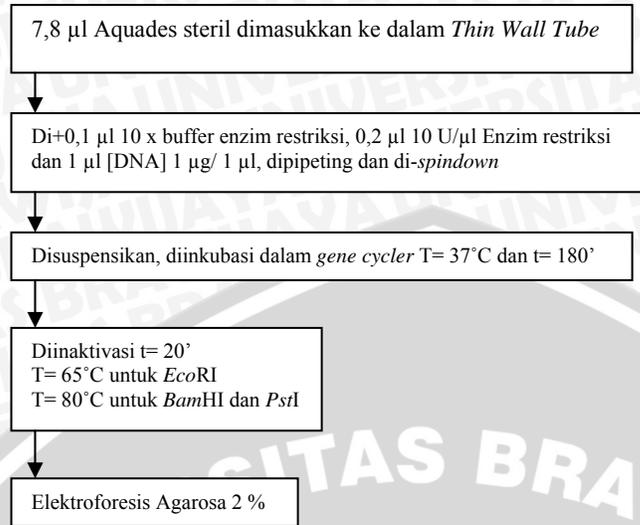
Lampiran 3. Isolasi DNA – Metode CTAB

- * Sentrifugasi v= 13.000 rpm, T= 4°C, t= 10'
- ** Sentrifugasi v= 13.000 rpm, T= 4°C, t= 5', divortex
- *** Sentrifugasi v= 13.000 rpm, T= 4°C, t= 15'

Lampiran 4. Metode Elektroforesis Agarose 2%



Lampiran 5. Metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)



Lampiran 6. Konsentrasi dan Kemurnian DNA 10 Varietas Tanaman Kedelai

Varietas	Konsentrasi DNA	Kemurnian DNA		Kontaminan
		230/260	260/280	
Anjasmoro	2735	1.871	1.708	Polisakarida, fenol atau protein
Argomulyo	2810	1.704	1.765	Polisakarida, fenol atau protein
Burangrang	2330	0.507	1.759	Polisakarida, fenol atau protein
Panderman	3145	0.455	1.789	Protein atau fenol
Sibayak	2955	1.739	1.941	Polisakarida
Ijen	2925	0.386	2.065	RNA
Kaba	3245	0.442	1.913	-
Sinabung	2005	1.519	1.801	Polisakarida
Tanggamus	1860	0.521	1.898	Polisakarida
Wilis	2780	0.639	1.922	Polisakarida

Lampiran 7. Fragmen hasil potongan DNA**Tabel 1. Fragmen hasil potongan DNA enzim restriksi *EcoRI***

Varietas	Jumlah Fragmen	Ukuran Fragmen (bp)
Anjasmoro	9	1500,1200,1000, 900 ,800,700,500,400,300
Argo mulyo	0	-
Burangrang	2	1000, 900
Panderman	5	1500,1000,700,500,400
Sibayak	0	-
Ijen	5	1200, 900 ,600,500,400
Kaba	0	-
Sinabung	0	-
Tanggamus	3	1000, 900 ,800
Wilis	0	-

Tabel 2. Fragmen hasil potongan DNA dengan enzim *BamHI*

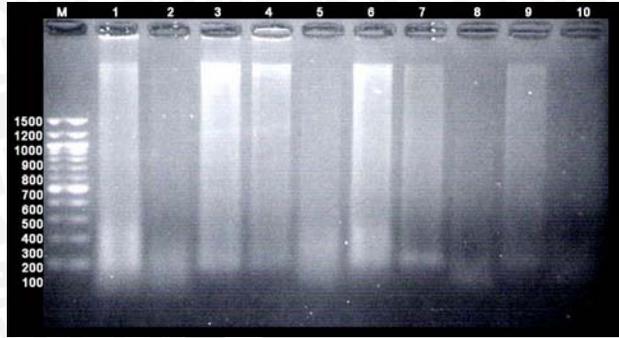
Varietas	Jumlah Fragmen	Ukuran Fragmen (bp)
Anjasmoro	7	1500,1200, 1000 ,700,600,400,300
Argo mulyo	6	1500, 1000 ,700,500,400,200
Burangrang	5	1000 ,900,800,400,200
Panderman	5	1000 ,700,500,400,100
Sibayak	9	1500,1200, 1000 ,700,600,500,400,200,100
Ijen	8	1500,1200,900,800,700,500,400,300
Kaba	5	1200, 1000 ,500,400,300
Sinabung	6	1200, 1000 ,900,800,700,300
Tanggamus	6	1500,900,800,700,600,200
Wilis	4	1500,900,600,200

Tabel 3. Fragmen hasil potongan DNA dengan enzim *PstI*

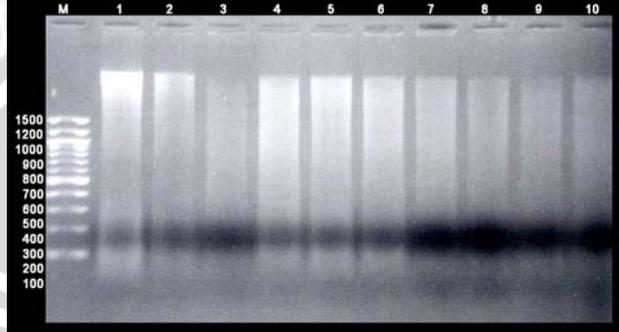
Varietas	Jumlah Fragmen	Ukuran Fragmen (bp)
Anjasmoro	10	1500,1200,1000,900,800,700,500, 400 ,200,100
Argo mulyo	6	1500,1200,1000,800,500,200
Burangrang	8	1500,1000,700,600,500, 400 ,300,100
Panderman	5	1500,600,500, 400 ,300
Sibayak	5	1500,600,500, 400 ,200
Ijen	6	1200,1000,800, 400 ,300,100
Kaba	6	1500,1000,800,500, 400 ,300
Sinabung	2	800,200
Tanggamus	4	1500,800,700, 400
Wilis	3	700, 400 ,100

Lampiran 8. Visualisasi pola restriksi DNA

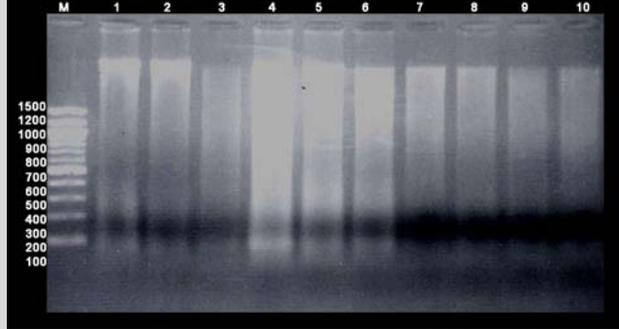
Gambar 1. Visualisasi pola restriksi DNA oleh enzim *EcoRI*



Gambar 2. Visualisasi pola restriksi DNA oleh enzim *BamHI*



Gambar 3. Visualisasi pola restriksi DNA oleh enzim *PstI*

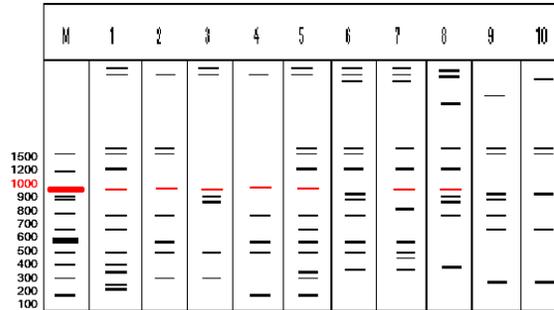


Lampiran 9. Diagram skematis pola restriksi DNA

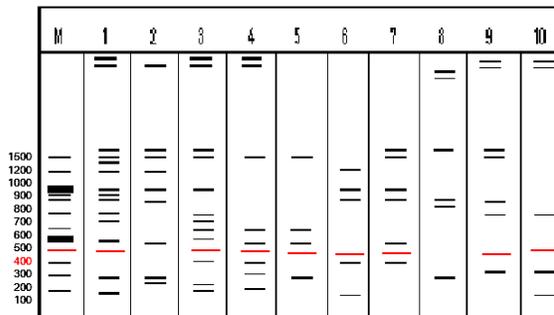
Gambar 1. Diagram skematis pola restriksi DNA oleh enzim *EcoRI*



Gambar 2. Diagram skematis pola restriksi DNA oleh enzim *BamHI*

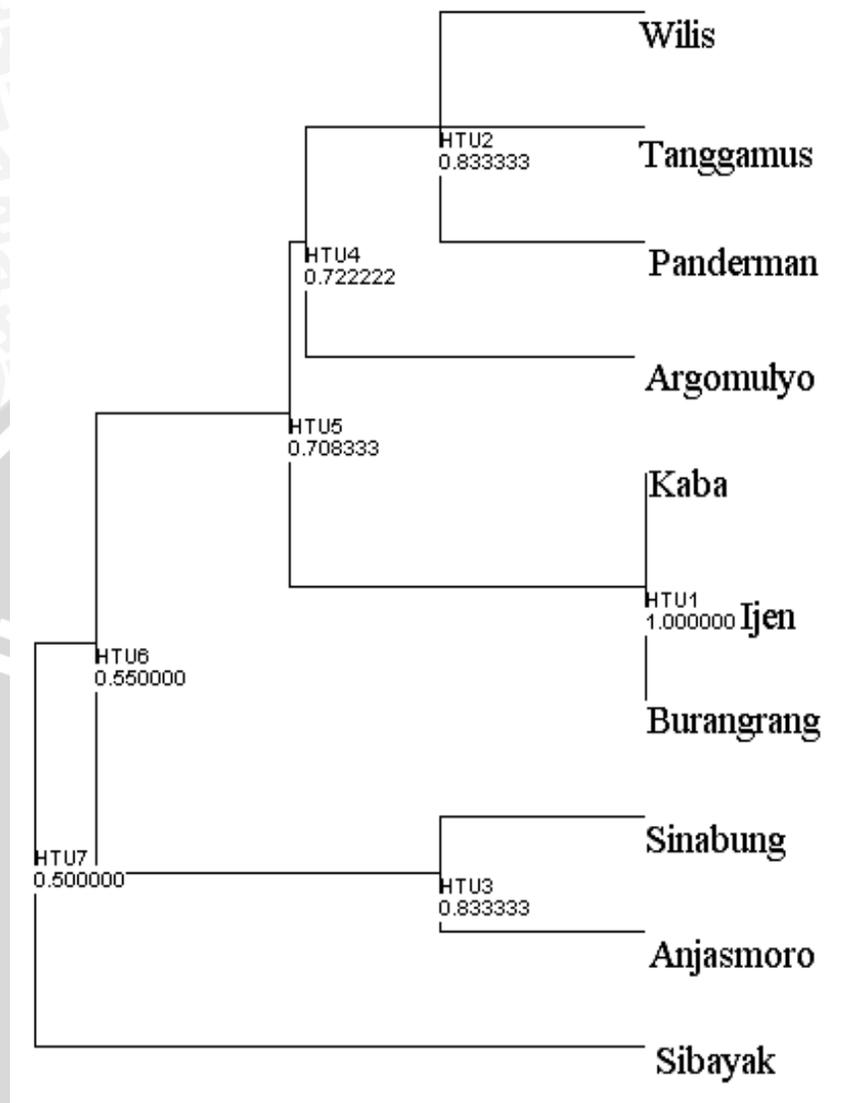


Gambar 3. Diagram skematis pola restriksi DNA oleh enzim *PstI*

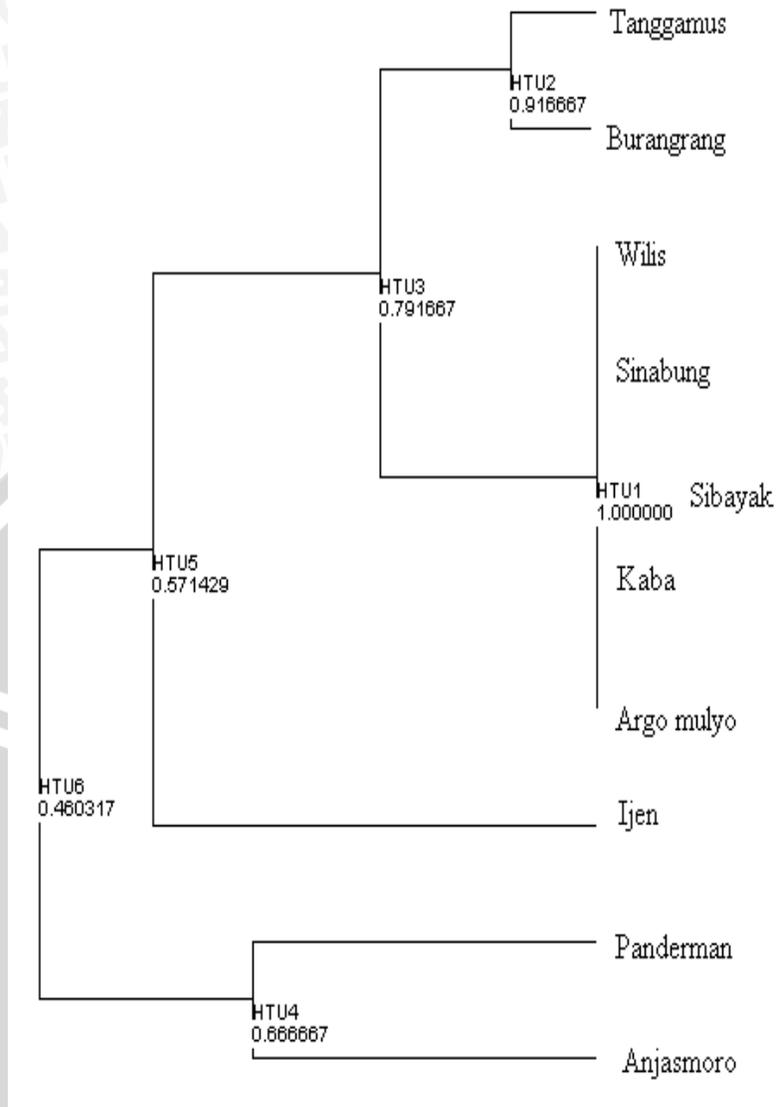


Lampiran 10. Fenogram hubungan kekerabatan 10 varietas tanaman Kedelai

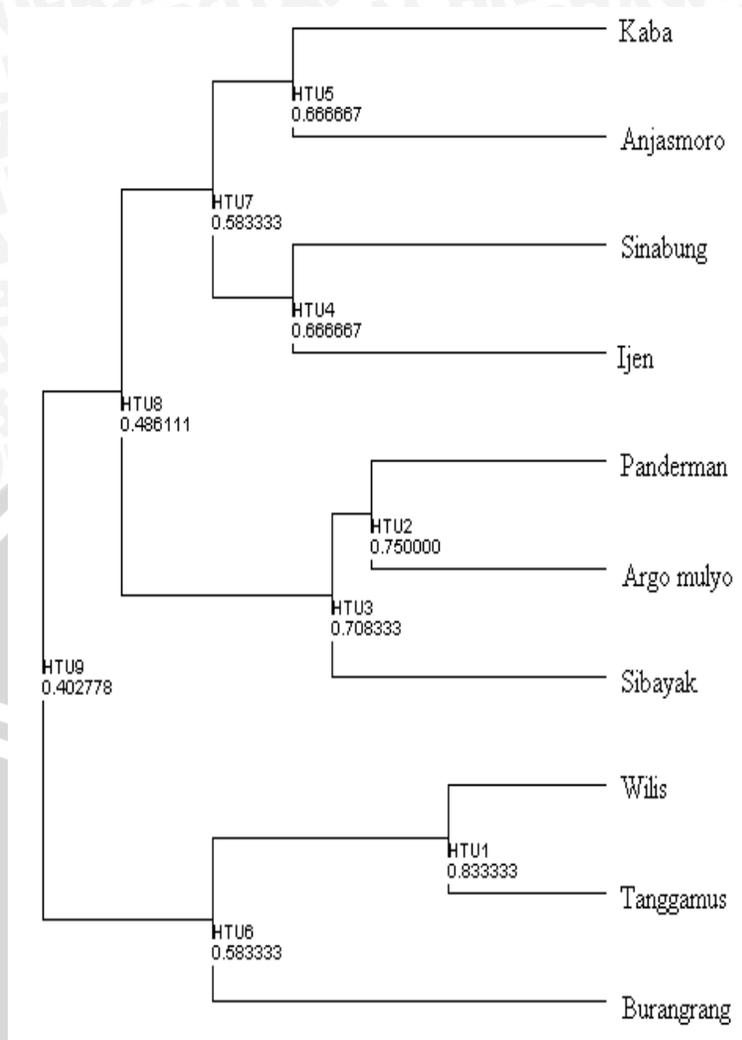
Gambar 1. Fenogram berdasarkan morfologi cabang



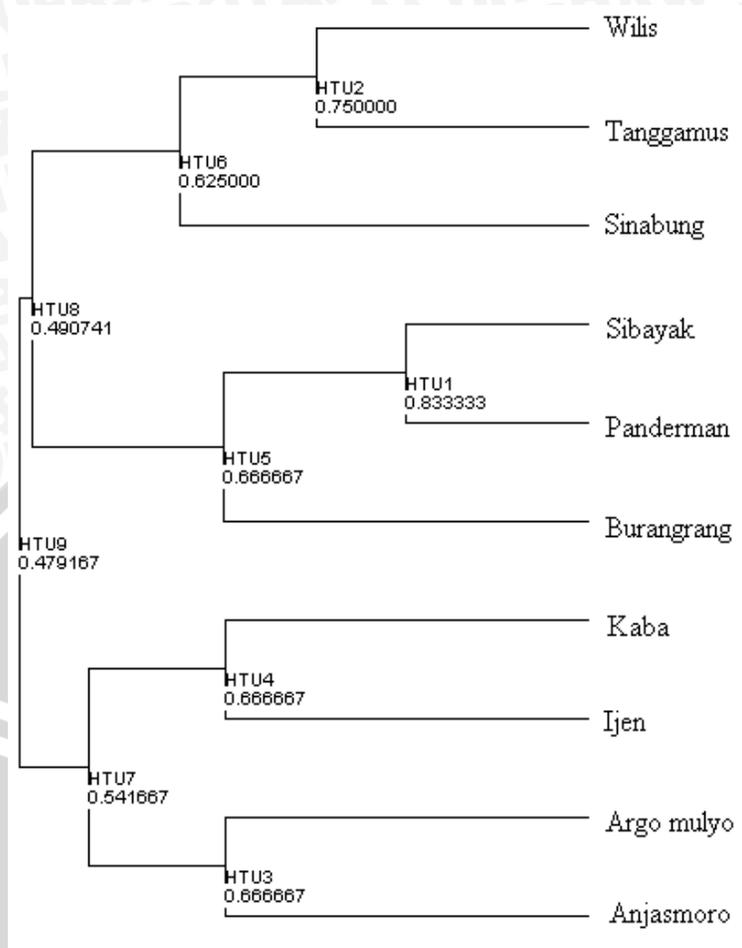
Gambar 2. Fenogram berdasarkan pola restriksi enzim *EcoRI*



Gambar 3. Fenogram berdasarkan pola restriksi enzim *Bam*HI



Gambar 4. Fenogram berdasarkan pola restriksi enzim *Pst*I



Gambar 5. Fenogram gabungan berdasarkan pola restriksi 3 enzim *EcoRI*, *BamHI*, dan *PstI*

