

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 - Februari 2017 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah media semai, inkubator *thermostat*, mikropipet, tip pipet, autoklaf, *spin down*, *blue sterile pastle*, parafilm, tabung *eppendorf* 2 mL, tabung *eppendorf* 1.5 mL, gelas ukur, labu Erlenmeyer, *96-well PCR plate*, batang magnet, sentrifus *5810R eppendorf*, vortex, mesin pendingin, sarung tangan karet, sudip, neraca analitik, *thermal cyclers* biometra TI, *ice maker*, spektrofotometer nanodrop *thermoscientific 2000c*, microwave, UV *transilluminator High Performance 2UV* dan perangkat elektroforesis.

Bahan yang digunakan adalah 41 genotipe kedelai introduksi dari USA dan 25 kedelai genotipe unggul Indonesia (Tabel 1), primer SNAP *forward* dan *reverse* masing-masing berjumlah 10 pasang (Tabel 2), nitrogen cair, polivinilpirolidon (PVP) 2%, larutan *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) 2%,  $\beta$ -merkaptotanol 0,2%, natrium bisulfit 0,38%, isopropanol dingin, natrium asetat (NaOAc) 3M, kloroform isomilalkohol (chisam) 24:1, RNAase, etanol 70% dingin, bufer Tris-EDTA (TE) 1x pH 8.0, KAPA2G *Fast ReadyMix PCR Kit* yang terdiri dari KAPA2G *Fast DNA Polimerase* (0,5 U per 25 $\mu$ L reaksi) dalam buffer reaksi (dNTPs 0,2 mM untuk 1x reaksi, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM untuk 1x reaksi, *stabilizer* dan *tracking dye* 2x), *Double Distilled Water* (ddH<sub>2</sub>O), gel agarosa, buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1x pH 8.0, SYBR<sup>®</sup> *Gold Nucleic Acid Gel Stain* (100x di TE), *Blue Juice*<sup>™</sup> *Gel Loading Buffer* (4x) dan *TrackLt*<sup>™</sup> 100 bp Plus DNA *Ladder* Invitrogen (Mubarok, 2015).

Tabel 1. Daftar 66 Genotipe Kedelai yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Nama	Asal	No.	Nama	Asal	No.	Nama	Asal	No.	Nama	Asal
1	Early Sunrise	SD, US	18	Hartwig	MSR, US	35	Daksoy	ND, US	52	Krakatau	Indonesia
2	Houjaku Kuwazu	Jepang	19	Lee 74	MSP, US	36	Chun_Dou	China	53	Sindoro	Indonesia
3	Suweon 97	Korsel	20	Cobb	Florida, US	37	Bolivar	MSP, US	54	Seulawah	Indonesia
4	Johnston	NC, US	21	Manchukota	China	38	Pace	MSP, US	55	Baluran	Indonesia
5	Lawrence	Illinois, US	22	Braxton	Florida, US	39	Tie-Feng-8	China	56	Leuser	Indonesia
6	Flyer	Ohio, US	23	Dowling	Texas, US	40	LS_201	Lowa, US	57	Detam 2	Indonesia
7	GR 8836	Ohio, US	24	Brim	NC, US	41	Desha	ND, US	58	Pangrango	Indonesia
8	Sprite	Ohio, US	25	Sandusky	Ohio, US	42	Malabar	Indonesia	59	Gepak Ijo	Indonesia
9	Ripley	Ohio, US	26	Lyon	MSP, US	43	Lumajang Bewok	Indonesia	60	Bromo	Indonesia
10	Perrin	SC, US	27	Huang Mao Bai Shui Dou	China	44	Galunggung	Indonesia	61	Jaya Wijaya	Indonesia
11	Resnik	Ohio, US	28	Savoy	Illinois, US	45	Ijen	Indonesia	62	Tampomas	Indonesia
12	SS_202	Lowa, US	29	Dwight	Illinois, US	46	Wilis	Indonesia	63	Kaba	Indonesia
13	Hobbit	Ohio, US	30	TN4-94	TNS, US	47	Otau	Indonesia	64	Gepak Ijo (4440)	Indonesia
14	Hoyt	Ohio, US	31	Apollo	Michigan, US	48	Davros (1248)	Indonesia	65	Merapi	Indonesia
15	Pixie	Ohio, US	32	Stout	Ohio, US	49	Gumitir	Indonesia	66	Muria	Indonesia
16	Gnome 85	Ohio, US	33	HS93-4118	Ohio, US	50	Mitani	Indonesia			
17	Archer	Lowa, US	34	Strong	Ohio, US	51	Cikuray	Indonesia			

Ket : SD = South Dakota, ND = North Dakota, SC = South Carolina, NC = North Carolina, MSR = Missmouri, MSP = Mississippi, TNS = Tennessee, MCG = Michigan, US = United States, Korsel = Korea Selatan.

Tabel 2. Pasangan Primer yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Primer SNAP	Alel Ref	Alel Alt	Sekuen (5' - 3')	Deskripsi Gen	Ukr. Prod. (bp)	Siklus	Suhu Ann. (bp)
1	SOY-SNAP 1,1 L	A	T	F-GCACAGGATCCAGATCACTGATACCTGTAAGA	Auxin response factor	375	38	63
				R-ATGTTTGAAACTGAAGACTCAGGAACAAGAAGG				
2	SOY-SNAP 1,2 L	A	G	F-GTTGCATGTTTGGATTGACTATGAAGCTAGTTAAAA	Legume lectin domain	335	38	63
				R-ATATCATTGCAGCAAGAACTCTCAAAAAGCAAT				
3	SOY-SNAP 1,3 L	A	C	F-TTTTCCAACAACAGCATTTTCAAAATTGTTACA	Peroxidase	328	38	63
				R-GGTTGATTGATTGTAAGAAGAAAAGAGAAAAGG				
4	SOY-SNAP 1,4 L	T	A	F-AACGTAAAATATGAAATTAGACACTATCTTCGCTT	Chitinase class I	326	38	63
				R-TTTCTCAGTGACTAATAACCTGTGGTCTCGTGA				
5	SOY-SNAP 1,5 L	T	A	F-CTCAATGCCTCAACATCAATGCGTGT	Myb-like DNA-binding domain	347	38	63
				R-TGAAAAGACCTGAGATTGTCACATTCTGTCC				
6	SOY-SNAP 2,1 L	T	G	F-GGATGTGAGGATGAGCAGGGTAAGAT	Pollen proteins Ole e I like	350	38	63
				R-TCATCATTTTCACCTTTCAGCCATTTC				
7	SOY-SNAP 2,2 L	G	T	F-GATGAGTTGCAAAGCTTGACACACCTACG	No apical meristem (NAM) protein	332	38	63
				R-AGCTCAAAATTTCTGTACAAGCAAGAAGAGATC				
8	SOY-SNAP 2,3L	T	G	F-CCCGTTTTTCGGCTCTGAAGGCT	Galactoside-binding lectin	346	38	63
				R-AAAGCTTCCATTTCATTATTTCATTCTCC				
9	SOY-SNAP 2,4 L	T	C	F-CATGTTCAAAAGTTCCATCCACAGACAAAGTT	Protein tyrosine kinase	343	38	63
				R-CAGAAGAGAAGAGAAAAGTACGAGGAACAGGC				
10	SOY-SNAP 2,5 L	G	A	F-GATGTTGATGAAGAAGATGAGGCATCAGTTG	Stigma-specific protein, Stig1	374	38	61
				R-TAGACAACGTCCACCGCCATAACA				

Ket: Ref = Reference, Alt = Alternate, Ann = Annealing, ukr. Prod. = Ukuran Produk.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Identifikasi Keragaman dan Kekekabatan Berdasarkan Marka SNAP

##### A. Penanaman dan Pengambilan Sampel

Kedelai ditanam di polibag masing-masing tiga benih per genotipe dan selanjutnya tanaman djarangkan menjadi satu tanaman. Tanaman dipelihara sesuai dengan rekomendasi budidaya kedelai. Setelah 3-5 minggu, batang dan daun kedelai sehat dipotong dan dimasukkan kedalam plastik zip yang sebelumnya sudah diberi nama/label dan disimpan kedalam freezer yang bersuhu -50°C sampai diisolasi DNAny.

##### B. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan metode Doyle & Doyle yang dimodifikasi (1987). Daun dipotong  $\pm 2 \text{ cm}^2$ , kemudian dimasukkan kedalam tabung *ependorf* 2 mL. Buffer ekstraksi yang terdiri dari 2% CTAB, 2% PVP, 0,2%  $\beta$ -merkaptoetanol, dan 0,38% natrium bisulfit dipanaskan dan dilarutkan pada suhu 60°C, kemudian dimasukkan sebanyak 500 $\mu$ L (3/4 volume) kedalam tabung *ependorf* yang berisi daun. Daun dihancurkan menggunakan *blue pastle* sampai halus. Setelah halus, sisa buffer ekstraksi yang belum dimasukkan (250  $\mu$ L) ditambahkan kedalam tabung. Sampel diinkubasi selama 60 menit pada suhu 65°C dan secara berkala dilakukan pencampuran, lalu ditambahkan kloroform isoamilalkohol 750  $\mu$ L. Sampel dibolak-balik secara perlahan selama 5 menit agar bahan tercampur, kemudian disentrifus selama 15 menit pada kecepatan 12000 rpm (20°C). Setelah selesai disentrifus, lapisan atas hasil sentrifus dipindahkan ke dalam tabung 1.5 mL baru, kemudian (1/10 x volume supernatan) Na asetat 3M ditambahkan kedalam supernatan dan dibolak-balik secara perlahan agar bahan tercampur. Setelah itu isopropanol dingin sebanyak 1 x volume supernatan ditambahkan kedalam supernatan, kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, bolak-balik sebentar, kemudian sampel diinkubasi kembali pada suhu -20°C selama 15 menit.

Pada akhir inkubasi, sampel disentrifus selama 20 menit pada kecepatan 12000 rpm (10°C). Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet dibilas dengan 200  $\mu$ L ethanol dingin 70%. Sampel disentrifus kembali pada 12000 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifus tersebut dibuang kembali dan

pelet dikeringkan menggunakan alat *SpeedVac Concentrator*. Endapan hasil pengeringan kemudian dilarutkan dengan 100  $\mu\text{L}$  bufer TE pH 8.0 dan dipanaskan pada suhu 65°C hingga larut. Enzim RNase sebanyak 2  $\mu\text{L}$  ditambahkan, kemudian diinkubasi kembali dengan suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya DNA hasil isolasi diuji kualitas dan kuantitasnya (Mubarok, 2015).

### C. Analisis Kualitatif DNA

Analisis kualitatif DNA menggunakan modifikasi Sambrook dan Russel (2001). Uji kualitatif DNA menggunakan elektroforesis pada gel agarosa sebesar 1%. Pembuatan gel agarosa yaitu dengan cara menambahkan agarosa 0,6 g kedalam larutan TAE 1x sebanyak 60 mL. Campuran tersebut kemudian dipanaskan sampai larut, kemudian ditunggu sampai panasnya berkurang (dari panas ke hangat), kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel. Setelah padat, gel dipindah ke bak elektroforesis yang berisi TAE 1x. Kemudian, dibuat *loading buffer* yang terdiri dari campuran SYBR Gold 100x 0.5  $\mu\text{L}$ , *blue juice* 4x 2  $\mu\text{L}$  dan ddH<sub>2</sub>O 2.5  $\mu\text{L}$ . Setelah itu 3  $\mu\text{L}$  DNA ditambahkan kedalam *loading buffer* tersebut dan diinjeksi kedalam sumur gel agarosa. Marka yang digunakan adalah DNA *ladder* Invitrogen sebanyak 1  $\mu\text{L}$  yang ditambah SYBR Gold 100x sebanyak 0.5  $\mu\text{L}$ . Setelah semua sampel diinjeksi, alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* dengan tegangan 90 volt selama 1 jam. Hasil elektroforesis difoto dengan bantuan lampu UV dalam *High Performance* 2UV (Mubarok, 2015).

### D. Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA menggunakan alat *Spectrophotometer NanoDrop*<sup>TM</sup> 2000 *Thermo Scientific* dengan blanko menggunakan larutan TE pH 8.0. Cara pelaksanaannya adalah lubang optik dibersihkan dahulu menggunakan *nuclease water*. Larutan TE sebanyak 2  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam lubang optik nanodrop *thermoscientific* dan kemudian pada komputer dipilih menu *measure blank*. Setelah itu lubang optik dibersihkan kembali dan dimasukkan 2  $\mu\text{L}$  DNA ke dalam lubang optik. Hasil pengukuran akan muncul dalam konsentrasi ng/ $\mu\text{L}$  dan kemurnian DNA dapat dilihat langsung dalam rasio panjang gelombang  $A_{260}/A_{280}$  dan  $A_{260}/A_{230}$  (Mubarok, 2015).

### **E. Amplifikasi PCR Menggunakan Marka SNAP**

DNA genom 66 genotipe kedelai yang terdiri dari 41 genotipe introduksi dan 25 genotipe unggul nasional diamplifikasi menggunakan 10 pasang primer SNAP. Amplifikasi PCR dilakukan dengan membuat 10  $\mu\text{L}$  campuran bahan yang terdiri dari 40  $\text{ng}/\mu\text{L}$  DNA genom sebanyak 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{M}$  primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 0.5  $\mu\text{L}$ , KAPA2G sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dan  $\text{ddH}_2\text{O}$  sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR. Masing-masing tabung PCR yang berisi bahan dimasukkan ke dalam mesin PCR Biometra *Thermal Cycler* dan reaksi PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu  $94^\circ\text{C}$  selama 5 menit, kemudian diikuti dengan amplifikasi DNA sebanyak 38 siklus dengan ketentuan: denaturasi pada suhu  $94^\circ\text{C}$  selama 30 detik, *annealing* dan ekstensi pada suhu  $63^\circ\text{C}$  selama 1 menit, dan tahap terakhir ekstensi pada suhu  $72^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan elektroforesis pada 1,5% gel agarosa. Tangki elektroforesis dihubungkan pada *power supply* dengan tegangan 90 volt selama 1,5 jam. Hasil elektroforesis divisualisasikan pada UV *transilluminator*. Setiap pita yang terbentuk (alel *reference*) dan tidak terbentuk (alel *alternate*) dikonversi menjadi data alel SNP. Konversi disesuaikan dengan rancangan primer dan database SNP pada Pusat Genom Pertanian Indonesia (PGPI) ([www.genom.litbang.pertanian.go.id](http://www.genom.litbang.pertanian.go.id)) (Mubarok, 2015; Lestari dan Koh, 2013).

### **F. Analisis Data Marka SNAP**

#### **Analisis tingkat polimorfisme dan heterozigositas Berdasarkan marka SNAP**

Hasil elektroforesis diskor berdasarkan ada tidaknya pita. Nilai 1/1 jika terdapat pita dan 2/2 jika tidak terdapat pita. Hasil penyekoran disimpan dalam format txt. Data kemudian dimasukkan ke dalam program PowerMarker V3.25 melalui menu *File-Import-Dataset*. Analisis statistika heterozigositas, diversitas gen (heterozigositas harapan) dan *Polimorphisms Information Content* (PIC) melalui menu *Analysis-Summary-Summary Statistics* (Mubarok, 2015; Liu, 2001).

### Konstruksi filogenetik dan jarak genetik

Konstruksi filogenetik dibuat dengan mengubah data hasil penyekoran kedalam format biner. Nilai 1 jika terdapat pita dan nilai 0 jika tidak terdapat pita. Data disimpan menggunakan format .xls (*Excel 97-2003 Workbook*), kemudian dibuka menggunakan program Ntedit dan disimpan dalam format .NTS. Data kemudian dianalisis menggunakan program NTSYS v2.11X. Analisis kesamaan genetik menggunakan menu *Similarity – Qualitative data* dengan koefisien SM (*Simple Matching*). Pengelompokan (*clustering*) dilakukan dengan menggunakan menu *Clustering – SAHN* dengan metode *clustering* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Penampilan konstruksi filogenetik dilakukan menggunakan menu *Graphics – Tree Plot*. Analisis jarak genetik dilakukan dengan membuka file hasil *Similarity* dalam program Ntedit atau *Microsoft Excel* (Rohlf, 2000).

### 3.3.2 Identifikasi Keragaman dan Kekerabatan Berdasarkan Karakter Morfologi dari Database

Data karakter morfologi 41 genotipe kedelai introduksi USDA didapat dengan mengakses website <https://npgsweb.ars-grin.gov/>, sedangkan data morfologi 25 genotipe kedelai unggul nasional diperoleh dari buku “Deskripsi Varietas Unggul Kedelai 1981-2016” yang diterbitkan oleh Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi) (Balitkabi, 2016). Data morfologi yang digunakan meliputi data kualitatif (warna bunga, warna biji dan tipe percabangan), dan kuantitatif (tinggi tanaman, berat 100 biji, kandungan protein, kandungan minyak dan hasil panen). Pengkategorian karakter kualitatif dapat dilihat di Tabel 3.

Tabel 3. Pengkategorian Karakter Morfologi Kualitatif

No.	Karakter	Kode
1.	Warna Bunga	1 = Putih 2= Ungu
2.	Warna Biji	1= Kuning 2= Kuning Kehijauan 3= Hitam
3.	Tipe Percabangan	1= Determinate 2= Semi-Determinate 3= Indeterminate

Analisis keragaman karakter kuantitatif (*Min, Max, Mean, Standar Deviation* dan *Coefficient of Variation (CV)*) menggunakan Software NCSS 11 dengan menu *Analysis – Descriptive Analysis – Descriptive Statistics –Summary Tables*, sedangkan analisis keragaman karakter kualitatif menggunakan software PowerMarker v3.25 dengan menggunakan menu *Analysis-Summary-Summary Statistics*. Analisis Komponen Utama atau *Principal Component Analysis (PCA)* menggunakan software XLSTAT version 2016 dengan menu *Analyzing Data - Principal Component Analysis* dengan *PCA type* berdasarkan Pearson (n). Pengkategorian korelasi Pearson berdasarkan kategori Cohen (1988) dalam Weinberg & Abramowitz (2002) yang terdapat pada tabel 4.

Tabel 4. Pengkategorian Korelasi Pearson Berdasarkan Cohen (1988 dalam Weinberg & Abramowitz (2002))

<b>No.</b>	<b>Korelasi</b>	<b>Kekuatan</b>
1.	$r = \pm 0,50$	Kuat
2.	$r = \pm 0,30$	Moderat
3.	$r = \pm 0,10$	Lemah

Pembuatan pohon filogenetik / dendogram menggunakan software NCSS 11 dengan menggunakan menu *Analysis – Cluster Analysis – Hierarchical Clustering / Dendograms*. Pengklasteran menggunakan *Group Average (Unweighted Pair-Group)* dengan *Distance Method* menggunakan Eucladian dan *Scalling Method* menggunakan *Standar Deviation* (Yang *et al.*, 2015).