

**VERIFIKASI F1 KEDELAI HASIL PERSILANGAN VARIETAS
GROBOGAN DAN BIOSOY 1 DENGAN KEDELAI
INTRODUKSI MENGGUNAKAN MARKA SSR**

SKRIPSI

Oleh:

HADYAN TAUFIQ NUR FAUZI



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG**

2019

**VERIFIKASI F1 KEDELAI HASIL PERSILANGAN
VARIETAS GROBOGAN DAN BIOSOY 1 DENGAN KEDELAI
INTRODUKSI MENGGUNAKAN MARKA SSR**

**Oleh:
HADYAN TAUFIQ NUR FAUZI
155040200111148**

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT BUDIDAYA PERTANIAN**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG
2019**

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan dari komisi pembimbing. Skripsi ini tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di perguruan tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukannya dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, April 2019

Hadyan Taufiq Nur Fauzi



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : **Verifikasi F1 Kedelai Hasil Persilangan Varietas Grobogan dan Biosoy 1 dengan Kedelai Introduksi menggunakan Marka SSR**

Nama : Hadyan Taufiq Nur Fauzi

NIM : 155040200111148


Program Studi : Agroekoteknologi


Minat : Budidaya Pertanian

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Dr. Budi Waluyo, SP, MP.
 NIP. 19740525 199903 1 001


Dr. Ir. I Made Tasma, M.Sc.
 NIP. 19611223 198703 1 001

Diketahui,
 Ketua Jurusan Budidaya Pertanian




Nurul Aini, MS.
 NIP. 19601012 198601 2 001

Tanggal Persetujuan: **31 JUL 2019**



Scanned with
 CamScanner



LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I



Dr. Budi Waluyo, SP. MP.
NIP. 19740525 199903 1 001

Penguji II



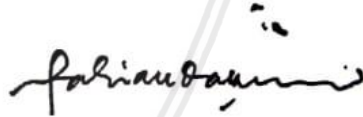
Dr. Ir. I Made Tasma, M.Sc.
NIP. 19611223 198703 1 001

Penguji III



Afifuddin Latif Adiredjo, SP., M.Sc., Ph.D
NIP. 19811104 200501 1 002

Penguji IV



Dr. Noer Rahmi Ardiarini, SP., M.Si.
NIP. 19701118 199702 2 001

Tanggal Lulus: 31 JUL 2019



Scanned with
CamScanner



RINGKASAN

HADYAN TAUFIQ NUR FAUZI (155040200111148). VERIFIKASI F1 KEDELAI HASIL PERSILANGAN VARIETAS GROBOGAN DAN BIOSOY 1 DENGAN KEDELAI INTRODUKSI MENGGUNAKAN MARKA SSR. Di bawah bimbingan Dr. Budi Waluyo, SP. MP. sebagai pembimbing utama dan Dr. Ir. I Made Tasma, M.Sc sebagai pembimbing pendamping.

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) ialah salah satu komoditas pangan yang dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia, selain padi dan jagung. Konsumsi kedelai nasional cukup tinggi, sedangkan produksi kedelai dalam negeri sangat rendah. Salah satu upaya yang dilakukan Pemerintah untuk mengurangi ketergantungan impor ialah dengan cara ekstensifikasi lahan pertanian. Akan tetapi, perluasan lahan dihadapkan pada tantangan besar yaitu tidak tersedianya lagi lahan-lahan optimal. Sehingga, ekstensifikasi lahan pertanian lebih difokuskan pada lahan-lahan suboptimal. Oleh karena itu, diperlukan adanya varietas-varietas kedelai mampu memproduksi dengan optimal meskipun ditanam pada lahan yang kurang optimal. Dalam penyediaan varietas kedelai baru, upaya yang dapat dilakukan salah satunya ialah kegiatan pemuliaan tanaman. Kegiatan pemuliaan tanaman dengan dukungan marka molekuler diharapkan dapat mempercepat proses seleksi karena marka molekuler mampu mendeteksi gen target tanpa dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga kegiatan pemuliaan tanaman menjadi lebih efektif. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk memverifikasi keberhasilan persilangan pada tanaman kedelai F1 putatif menggunakan marka SSR.

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2018 hingga April 2019 di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah kedelai varietas Grobogan, Biosoy 1, dan aksesori introduksi asal Amerika Serikat (PI 553045, PI 471938 dan PI 471931), tanah, pupuk organik kotoran sapi “Karyana”, kapur dolomit, pupuk NPK 16-16-20, gandasil D, gandasil B, insektisida Decis, kertas label, benang, sampel daun segar, PVP 2%, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), natrium bisulfit 0,38%, natrium asetat (NaOAc) 3M, kloroform isoamilalkohol 24:1, isopropanol, etanol 70%, buffer Tris-EDTA (TE) 1x pH 8.0, KAPA2G *Fast ReadyMix* PCR Kit, ddH₂O, gel agarose, buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1x pH 8.0, SYBR *Gold Nucleic Acid Gel Stain*, 1 kb DNA Ladder, *molecular water* (MW), 15 primer SATT untuk SSR-PCR, akrilamid-bisakrilamid 8%, *Ammonium Persulfate* (APS) 10%, TEMED, *Mix electrophoresis*, marker 1 kb, buffer Tris Borate EDTA (TBE) 1x pH 8.0, tube 1.5 ml, tube 2 ml, dan tisu KimWipes. Sedangkan alat yang digunakan ialah pot plastik 10 kg, *sprayer*, pinset, *blue pestle*, erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, tips, inkubator, *water bath*, *sentrifuge*, *tube rack*, lemari pendingin, Speedvac DNA Concentrator, *96-plate tube*, T1 Thermocycler (PCR), *plate gel* agarose, *plate gel* poliakrilamid, elektroforesis vertikal, elektroforesis horizontal, baki, dan UV Transilluminator. Metode penelitian ini terdiri dari penanaman tetua, persilangan, penanaman F1, isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA, PCR-SSR, elektroforesis gel poliakrilamid, dan visualisasi hasil elektroforesis. Variabel pengamatan terdiri atas jumlah bunga yang disilangkan, jumlah polong yang



terbentuk, persentase keberhasilan persilangan, dan keberhasilan persilangan dari hasil analisis molekuler. Analisis data dilakukan dengan Analisis Deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa verifikasi persilangan tanaman menggunakan 5 pasang primer terpilih menunjukkan dari 65 tanaman F1 putatif yang diuji, sebanyak 15 tanaman terverifikasi merupakan *true F1* karena memiliki pita DNA yang berasal dari gabungan pita DNA kedua tetua. F1 positif terbanyak terdapat pada populasi Grobogan x Introduksi 12 dan Grobogan x Introduksi 13, yaitu sebanyak 5 tanaman. Sedangkan F1 positif paling sedikit terdapat pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 10, yaitu sebanyak 2 tanaman F1.



SUMMARY

HADYAN TAUFIQ NUR FAUZI (155040200111148). VERIFICATION OF F1 SOYBEAN FROM CROSSING BETWEEN GROBOGAN AND BIOSOY 1 WITH INTRODUCTION VARIETY USING SSR MARKER. Supervised by Dr. Budi Waluyo, SP. MP. and Dr. Ir. I Made Tasma, M.Sc.

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is one of the food commodities consumed by Indonesian people, besides rice and corn. National soybean consumption is quite high, while domestic soybean production is very low. One of the efforts made by the Government to reduce import dependence is by extending agricultural land. However, land expansion is faced with a major challenge, which is the unavailability of optimal land. Thus, the extensification of agricultural land is more focused on suboptimal lands. Therefore, there is a need for soybean varieties that able to produce optimally even though it is planted on suboptimal land. To supply new soybean varieties, one of the efforts that can be done is plant breeding activities. Plant breeding activities with molecular marker support are expected to accelerate the selection process because molecular markers can detect target genes without being influenced by the environment, so that plant breeding activities are more effective. The objective of this study was to verify the success of crosses on putative F1 soybean plants using SSR markers.

The research was conducted from November 2018 to April 2019 at the Indonesian Center of Agriculture Biotechnology and Genetic Resources Research and Development in Bogor. The materials used in this study were varieties of Grobogan, Biosoy 1, and introduction accessions from the United States (PI 553045, PI 471938 and PI 471931), soil, "Karyana" cow manure, dolomite lime, 16-16-20 NPK fertilizer, gandasil D, gandasil B, Decis insecticide, paper label, yarn, fresh leaf samples, 2% PVP, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), sodium bisulfite 0.38%, sodium acetate (NaOAc) 3M, chloroform isoamylalcohol 24: 1, isopropanol, ethanol 70%, Tris-EDTA buffer (TE) 1x pH 8.0, KAPA2G Fast Ready Mix PCR Kit, ddH₂O, agarose gel, Tris Asetat EDTA buffer (TAE) 1x pH 8.0, SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, 1 kb DNA Ladder, molecular water (MW), 15 SATT primers for SSR-PCR, acrylamide-bisacrylamide 8%, Ammonium Persulfate (APS) 10%, TEMED, Mix electrophoresis, 1 kb marker, Tris Borate EDTA buffer (TBE) 1x pH 8.0 , tube 1.5 ml, tube 2 ml, and tissue KimWipes. While the tools used are 10 kg plastic pot, sprayer, tweezers, blue pestle, Erlenmeyer, measuring cup, micropipette, tips, incubator, water bath, centrifuge, tube rack, refrigerator, Speedvac DNA Concentrator, 96-plate tube, T1 Thermocycler (PCR), agarose gel plate, polyacrylamide gel plate, vertical electrophoresis, horizontal electrophoresis, tray, and UV Transilluminator. This research method consists of planting parents, crossing, F1 planting, DNA isolation, qualitative and quantitative DNA testing, PCR-SSR, polyacrylamide gel electrophoresis, and visualization of electrophoresis results. Observation variables consisted of the number of crossed flowers, the number of pods formed, the

percentage of successes in crosses, and the success of crosses from the results of molecular analysis. Data analysis was carried out by descriptive analysis.

The results showed that verification of plant crosses using 5 selected primary pairs showed that of 65 putative F1 plants tested, as many as 15 verified plants were true F1 because they had DNA bands originating from a combination of the two parents' DNA bands. The most positive F1 was found in the population of Grobogan x Introduction 12 and Grobogan x Introductions 13, which were as many as 5 plants. While F1 positive is the least found in the Biosoy 1 x Introduction 10 population, which is as much as 2 F1 plants.



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT yang telah senantiasa memberikan rahmat dan ridhaNya sehingga pada akhirnya penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul **“Verifikasi F1 Kedelai Hasil Persilangan Varietas Grobogan dan Biosoy 1 dengan Kedelai Introduksi”** ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana program strata satu Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang tepat pada waktu yang telah ditentukan.

Pembuatan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua, Bapak Sarno dan Ibu Purwani Indri Astuti, serta Mas Fathurosy Yustisiawan Nur Imani atas setiap doa dan dukungannya,
2. Dr. Budi Waluyo, SP. MP. yang telah meluangkan waktu untuk segala, bimbingan, bantuan, dan kepercayaannya pada penulis untuk melaksanakan penelitian ini,
3. Dr. Ir. I Made Tasma, M.Sc. yang telah memberikan arahan dan kesempatan kepada penulis untuk melakukan penelitian dalam proyek penelitian beliau,
4. Tim Laboratorium Genom, Pak Kristianto Nugroho, SP., Bu Rerenstradika T. Terryana, SP., M.Si., mbak Rosliana P. Dyah, S.Si., mbak Mufidah, SP., mbak Ratih Lestari, SP., mbak Rani, S.Si., mbak Tika, SP., om Meddy, A.Md., mas Fata, S.Si., mas Kifly, SP., mas Mufti, SP., dan mbak Sherly, S.P., atas bantuan dan dukungan selama penulis melakukan penelitian.
5. Sahabat penelitian, terutama Nadia Della Savitri Ayu Ningrum, dan kawan-kawan seperjuangan Apik, Shofie, Janitra, Elfita, Maf, Ferian, Yana, dan Samsiyah yang selalu memberikan dukungan bagi penulis.

Penulis menyatakan bahwa penyusunan skripsi ini adalah penulisan terbaik yang pernah dibuat oleh penulis. Karena penulis telah mencurahkan semua waktu, tenaga, dan pikiran dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga proposal skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak.

Malang, April 2019

Penulis

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Surakarta, Jawa Tengah pada tanggal 17 Juni 1997 sebagai putra kedua dari pasangan Bapak Sarno, S.H. dan Ibu Purwani Indri Astuti, S.S., M.Hum, dan merupakan adik dari Fathurosy Yustisiawan Nur Imani, S.Sos.

Penulis menempuh pendidikan dasar di SD Djama'atul Ichwan Surakarta (2002-2009), pendidikan menengah di SMPN 10 Surakarta (2009-2012). Penulis merupakan lulusan SMA Negeri 7 Surakarta tahun 2015, dan pada tahun yang sama diterima menjadi mahasiswa S-1 Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, melalui jalur SBMPTN.

Selama berada di bangku perkuliahan, penulis aktif menjadi asisten praktikum pada beberapa mata kuliah, yaitu Botani, Biokimia, Bioteknologi, dan Teknologi Produksi Benih. Penulis juga aktif sebagai staf Divisi Kepelatihan Unit Kegiatan Mahasiswa Panahan pada tahun 2017. Penulis juga tercatat mengikuti kegiatan kepanitaan Brawijaya Archery Championship 2018 sebagai Ketua Divisi Kestari. Pada tahun 2018, penulis mengikuti kegiatan magang di Kelompok Peneliti Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor dengan judul makalah Uji *Cross Amplification* Padi Lokal menggunakan Marka SSR Rumput Gajah.

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
RIWAYAT HIDUP	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Hipotesis	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Kedelai.....	3
2.2 Marka Genetik	3
2.3 Aplikasi Teknologi Marka dalam Kegiatan Pemuliaan Kedelai	6
3. BAHAN DAN METODE	8
3.1 Persilangan Tanaman Kedelai	8
3.2 Verifikasi Tanaman F1 Putatif menggunakan Marka SSR	11
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Hasil.....	16
4.2 Pembahasan	35
5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1. Kesimpulan.....	40
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	44

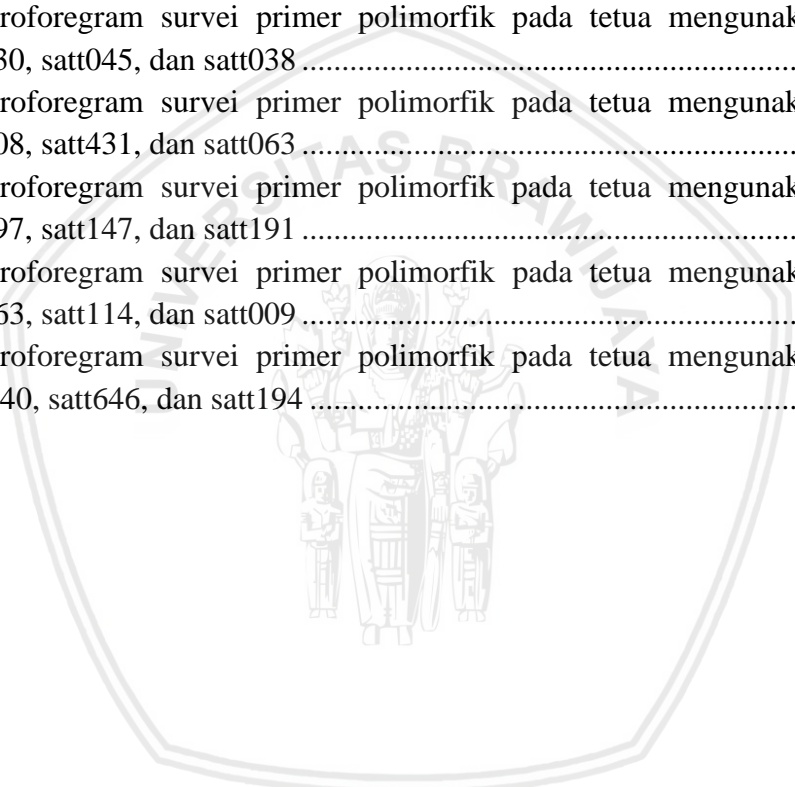
DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
1.	Jenis-Jenis Marka	4
2.	Aksesi Introduksi asal Amerika Serikat	8
3.	Umur Berbunga Tetua Kedelai	9
4.	Jadwal Penanaman Tetua Kedelai.....	9
5.	Populasi Persilangan Kedelai	10
6.	Daftar Primer Marka SSR yang Digunakan pada Penelitian	14
7.	Pembentukan F1 Putatif Hasil Persilangan	16
8.	Hasil Uji Kuantitatif DNA	18
9.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 10.....	22
10.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 12	23
11.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 13	24
12.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 10	25
13.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 12	26
14.	Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 13	27
15.	Tabulasi Hasil Verifikasi Tanaman F1 Putatif.....	35

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
1.	Perbandingan Ukuran Bunga Grobogan dan Biosoy 1	17
2.	Hasil Uji Kualitatif DNA Tetua	20
3.	Hasil Uji Kualitatif DNA Sampel Tanaman F1 Putatif	20
4.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt063 b) primer satt197	29
5.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt009 b) primer satt431	30
6.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt009 b) primer satt431	31
7.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt009 b) primer satt308	32
8.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt009 b) primer satt197	33
9.	Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi yang diamplifikasi. a) primer satt009 b) primer satt197	34
10.	Mengaplikasikan kapur dolomit pada pot	46
11.	Mengaplikasikan pupuk kandang pada pot	46
12.	Mencampur kapur dolomit dan pupuk kandang dengan tanah	46
13.	Petak berisi pot-pot untuk penanaman	46
14.	Bunga betina yang masih kuncup sebelum dilakukan kastrasi	47
15.	Proses kastrasi dan emaskulasi pada bunga betina	47
16.	Proses meletakkan kotak sari pada putik	47
17.	Bunga hasil persilangan yang ditandai dengan benang jahit	47
18.	Persiapan perawatan menggunakan larutan pestisida dan fungisida.....	48
19.	Proses perawatan dengan menyemprotkan pestisida pada tanaman	48
20.	Polong berisi F1 hasil persilangan Biosoy 1 x Intoduksi 10.....	49
21.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	49
22.	Polong berisi F1 hasil persilangan Biosoy 1 x Introduksi 12.....	49
23.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	49
24.	Polong berisi F1 hasil persilangan Biosoy 1 x Introduksi 13.....	49
25.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	49
26.	Polong berisi F1 hasil persilangan Grobogan x Introduksi 10.....	50
27.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	50
28.	Polong berisi F1 hasil persilangan Grobogan x Introduksi 12.....	50
29.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	50
30.	Polong berisi F1 hasil persilangan Grobogan x Introduksi 13.....	50
31.	Penampilan biji hasil persilangan dengan tetua	50
32.	Penampilan Tanaman Introduksi 10 dan Grobogan.....	51

33. Penampilan Tanaman Introduksi 10 dan Biosoy 1	51
34. Penampilan Tanaman Introduksi 12 dan Grobogan.....	51
35. Penampilan Tanaman Introduksi 12 dan Biosoy 1	51
36. Penampilan Tanaman Introduksi 13 dan Grobogan.....	52
37. Penampilan Tanaman Introduksi 13 dan Biosoy 1	52
38. Penampilan polong Biosoy 1, Grobogan, dan Introduksi 10	52
39. Penampilan polong Biosoy 1, Grobogan, dan Introduksi 12	52
40. Penampilan polong Biosoy 1, Grobogan, dan Introduksi 13	53
41. Penampilan bunga tetua betina	53
42. Penampilan bunga tetua jantan	53
43. Penampilan bunga antar tetua	54
44. Elektroforegram survei primer polimorfik pada tetua menggunakan primer satt030, satt045, dan satt038	55
45. Elektroforegram survei primer polimorfik pada tetua menggunakan primer satt308, satt431, dan satt063	55
46. Elektroforegram survei primer polimorfik pada tetua menggunakan primer satt197, satt147, dan satt191	56
47. Elektroforegram survei primer polimorfik pada tetua menggunakan primer satt463, satt114, dan satt009	56
48. Elektroforegram survei primer polimorfik pada tetua menggunakan primer sat_140, satt646, dan satt194	57



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1.	Jadwal Penelitian.....	44
2.	Deskripsi Varietas Grobogan	45
3.	Kegiatan Persiapan Tanam.....	46
4.	Kegiatan Persilangan Kedelai	47
5.	Kegiatan Perawatan Tanaman.....	48
6.	Kegiatan Panen Hasil Persilangan	49
7.	Keragaman Karakter Genotipe Tetua.....	51
8.	Elektroforegram Survei Primer Polimorfik pada Tetua	55



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) ialah salah satu komoditas pangan yang dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia, selain padi dan jagung. Kedelai menjadi komoditas pangan yang penting karena kedelai memiliki kandungan nutrisi yang cukup baik, diantaranya protein sebanyak 40% dan lemak sebanyak 20% (Banaszkiewicz, 2011). Dengan kandungan nutrisi yang tinggi, maka kedelai dimanfaatkan sebagai salah satu komoditas pangan untuk pemenuhan kebutuhan gizi masyarakat Indonesia.

Konsumsi kedelai nasional cukup tinggi, sedangkan produksi kedelai dalam negeri sangat rendah. Hal ini ditunjukkan pada tahun 2016, terdapat penurunan luas panen kedelai sebesar 4,27% menjadi 589,42 ribu hektar (tahun sebelumnya 614,10 ribu hektar). Akibatnya, produksi kedelai pada tahun 2016 mengalami penurunan hingga 7,06% menjadi 887,54 ribu ton (tahun sebelumnya 963,18 ribu ton). Sehingga, untuk memenuhi konsumsi nasional, Pemerintah melakukan impor kedelai mencapai 1,96 juta ton (67,28%). (Nuryati *et al.*, 2016).

Berbagai upaya dilakukan untuk mengurangi ketergantungan terhadap impor kedelai. Salah satu upaya yang dilakukan Pemerintah ialah dengan cara ekstensifikasi lahan pertanian. Ekstensifikasi lahan ialah kegiatan perluasan lahan penanaman. Akan tetapi, perluasan lahan dihadapkan pada tantangan besar seperti alih fungsi lahan dan tidak tersedianya lagi lahan-lahan optimal. Sehingga, ekstensifikasi lahan pertanian lebih difokuskan pada lahan-lahan suboptimal. Tanaman kedelai umumnya ditanam pada lahan sawah, bukan pada lahan suboptimal. Pada tahun 2016, Indonesia memiliki lahan yang sementara belum diusahakan pertanian mencapai 11,96 juta hektar (Hakim *et al.*, 2017). Artinya, lahan-lahan suboptimal sangat potensial untuk dikembangkan menjadi lahan pertanian, terutama kedelai. Akan tetapi, kedelai kurang sesuai apabila ditanam pada lahan suboptimal. Oleh karena itu, diperlukan adanya varietas-varietas kedelai baru yang dapat berproduksi dengan optimal meskipun ditanam pada lahan suboptimal.

Dalam penyediaan varietas kedelai baru yang mampu berproduksi pada lahan suboptimal, upaya yang dapat dilakukan salah satunya ialah kegiatan pemuliaan tanaman. Kegiatan pemuliaan tanaman memerlukan ketersediaan sumber gen baru agar menghasilkan tanaman sesuai dengan tujuan awal, dalam hal ini mampu berproduksi pada lahan suboptimal. Salah satu cara memperoleh gen-gen tersebut ialah melalui introduksi tanaman dari daerah lain ke dalam Indonesia. Setelah itu, dilakukan persilangan agar tetua sumber gen dapat mendonorkan sifat baru. Namun, tanaman hasil persilangan belum benar-benar hasil dari persilangan, tanaman ini disebut sebagai tanaman putatif hasil persilangan (Tasma *et al.*, 2011). Tanaman putatif hasil persilangan perlu diverifikasi rekombinasinya untuk memastikan tanaman tersebut benar berasal dari hasil persilangan. Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan, teknologi pemuliaan menjadikan kegiatan pemuliaan semakin efektif. Salah satu teknologi pemuliaan ialah penggunaan marka molekuler. Penggunaan marka molekuler diharapkan dapat memverifikasi rekombinasi genetik yang terjadi pada tanaman putatif hasil persilangan. Kegiatan pemuliaan tanaman kedelai dengan menggunakan marka molekuler telah banyak dilakukan di Indonesia pada khususnya (Tasma, 2013; Terryana *et al.*, 2017). Sehingga, kegiatan pemuliaan tanaman kedelai yang dilakukan dapat berjalan lebih efektif dan efisien dengan menggunakan marka molekuler.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk memverifikasi keberhasilan persilangan pada tanaman kedelai F1 putatif menggunakan marka SSR.

1.3 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah marka SSR dapat digunakan untuk memverifikasi keberhasilan persilangan pada tanaman kedelai F1 putatif.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kedelai

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) ialah tanaman pangan yang termasuk ke dalam famili *Leguminosae*. Tanaman ini dipercaya berasal dari daerah China (Sammour, 2014; O'Keefe *et al.*, 2015). Terdapat dua subgenera pada genus *Glycine* liar, yaitu *Glycine* dan *Soja*. Subgenus *Soja* (Moench) F.J. Herm terdiri atas *Glycine max* (L.) Merrill, dan kerabat liarnya yaitu *Glycine soja* Sieb. & Zucc. Kedua spesies ini merupakan tanaman semusim. Tanaman kedelai *Glycine soja* ialah tetua liar dari tanaman kedelai *Glycine max* (yang dibudidayakan saat ini). Selain itu, terdapat pula *G. gracilis* yang dianggap sebagai spesies baru, karena memiliki banyak karakter yang berbeda dengan *G. max* dan *G. soja*. Subgenus *Glycine* terdiri atas 16 spesies kedelai liar yang merupakan tanaman tahunan, seperti *Glycine canescens* F.J. Herm, dan *G. tomentella* Hayata yang ditemukan di Australia dan Papua Nugini (Sammour, 2014).

Kedelai budidaya memiliki karakteristik berupa tanaman tegak yang memiliki tinggi antara 40-90 cm, memiliki percabangan, memiliki daun tunggal dan *trifoliolate*, memiliki bulu pada daun dan polong, serta berumur antara 72-90 hari. Bentuk biji bervariasi, mulai dari lonjong hingga bulat, sistem perakarannya tunggang dengan kemampuan membentuk bintil akar. Tanaman kedelai merupakan tanaman menyerbuk sendiri yang bersifat kleistogami. Terdapat dua tipe pertumbuhan, pertama ialah tipe *determinate*, yaitu tipe pertumbuhan dimana pertumbuhan vegetatif terminal berhenti ketika terjadi pembungaan. Tipe kedua yaitu *indeterminate*, dimana pertumbuhan vegetatif terminal tetap berlangsung ketika pembungaan muncul (Adie dan Krisnawati, 2007).

2.2 Marka Genetik

Kegiatan pemuliaan tanaman secara sederhana melalui persilangan telah menghasilkan tanaman-tanaman unggul yang bermanfaat bagi manusia. Seiring perkembangan waktu, keadaan alam semakin tidak menentu dan terus berubah-ubah. Keadaan ini menyebabkan adanya cekaman-cekaman baik biotik maupun abiotik yang mengancam keberlanjutan kehidupan tanaman. Hal ini membuat para pemulia tanaman berusaha mengembangkan tanaman-tanaman yang adaptif

dengan kondisi alam sekarang ini. Informasi genetik suatu tanaman sangat diperlukan dalam kegiatan pemuliaan. Dengan mengetahui informasi genetik tanaman, maka kegiatan pemuliaan diharapkan akan menjadi lebih efisien (Nadeem *et al.*, 2017). Dengan perkembangan ilmu pengetahuan yang pesat, urutan genom tanaman dan peran fisiologis serta molekular gen-gen tanaman telah dapat diketahui. Hal ini mendorong terjadinya revolusi dalam genetika molekular yang mengarah pada pemanfaatan marka genetik.

Marka genetik ialah sebuah gen atau urutan DNA yang diketahui letak kromosomnya yang mengatur gen atau sifat tertentu. Marka genetik terdiri atas marka klasik dan marka molekular (Tabel 1). Marka klasik terdiri atas marka morfologi, marka sitologi, dan marka biokimia. Marka morfologi ialah penanda yang secara visual mudah dibedakan, seperti struktur biji, warna bunga, tipe tumbuh, dan sifat agronomis lainnya. Marka sitologi ialah marka yang berkaitan dengan variasi jumlah, pola ikatan, ukuran, bentuk, urutan dan posisi kromosom. Sedangkan marka biokimia (sering disebut pula dengan marka isozim) ialah suatu bentuk enzim multi-molekular yang berasal dari kode-kode oleh berbagai gen, tetapi memiliki fungsi yang sama (Nadeem *et al.*, 2017). Marka-marka klasik tersebut memiliki kekurangan yaitu dipengaruhi oleh lingkungan (Kordrostami and Rahimi, 2015).

Tabel 1. Jenis-Jenis Marka

No.	Jenis Marka	Contoh Marka
1.	Marka Klasik (<i>non-DNA-based</i>)	
	a. Marka morfologi	
	b. Marka sitologi	
	c. Marka biokimia	
2.	Marka Molekular (<i>DNA-based</i>)	
	a. <i>Non-PCR-based</i>	RFLP
	b. <i>PCR-based</i>	RAPD, AFLP, SSR

Sumber: (Jonah *et al.*, 2011; Bekele and Bekele, 2014; Nadeem *et al.*, 2017)

Berbeda dengan marka klasik, marka molekular ialah urutan-urutan nukleotida dan dapat ditelusuri melalui adanya polimorfisme antara urutan nukleotida dari individu yang berbeda. Marka molekular menurut metode deteksinya terdiri atas marka molekular berbasis hibridisasi (berbasis non PCR)

dan marka molekuler berbasis PCR. Marka molekuler berbasis hibridisasi hanya terdiri atas satu macam marka saja, yakni marka *Restriction Fragmented Length Polymorphism* (RFLP). Marka RFLP menggunakan enzim restriksi untuk memotong sampel-sampel DNA pada lokus tertentu (*restriciton/recognition site*). Akibatnya akan terbentuk fragmen-fragmen DNA dengan panjang yang berbeda-beda tiap sampel. Marka ini biasanya didesain untuk mendeteksi alel pada sampel heterozigot (Garrido-Cardenas *et al.*, 2017). Kelebihan dari marka ini ialah kodominan, kemampuan mereproduksi tinggi, tidak membutuhkan informasi urutan basa, dan spesifik lokus tinggi. Sedangkan kekurangan marka ini ialah memerlukan DNA dalam jumlah yang banyak, memakan banyak waktu, prosedurnya kaku dan kompleks, serta melibatkan beberapa reagen yang bersifat radioaktif dan beracun (Henry, 2013; Bekele and Bekele, 2014; Lateef, 2015). Dengan keterbatasan-keterbatasan tersebut, maka dikembangkan marka yang lebih sederhana, yaitu marka molekuler berbasis PCR.

Marka molekuler berbasis PCR terdiri atas berbagai macam marka. Namun, beberapa marka yang sudah dikenal ialah marka *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragmented Length Polymorphism* (AFLP), dan *Simple Sequence Repeat* (SSR/mikrosatelit). Marka RAPD digunakan untuk mendapatkan fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda-beda setelah reaksi PCR. Primer RAPD akan menempel pada situs-situs DNA yang berbeda. Sehingga apabila situs penempelan berubah, maka produk amplifikasi juga berubah. Marka RAPD berukuran pendek (10 nukleotida) (Idrees and Irshad, 2014; Garrido-Cardenas *et al.*, 2017). Kelebihan marka ini ialah murah, cepat, mudah digunakan, hanya memerlukan DNA dalam jumlah yang sedikit, aman, primer tersedia secara komersial, dan tidak membutuhkan data sekuen untuk membentuk primer. Sedangkan kekurangan marka ini ialah bersifat dominan, tidak mampu mendeteksi perbedaan alel heterozigot, kemampuan reproduksi rendah, memerlukan standar prosedur yang tinggi, tidak spesifik lokus, dan memerlukan kualitas DNA yang baik (Jonah *et al.*, 2011; Henry, 2013; Bekele and Bekele, 2014; Lateef, 2015). Marka AFLP mengombinasikan metode marka RFLP dan PCR fragmen DNA restriksi (Nadeem *et al.*, 2017). Kelebihan marka ini ialah efektif dan efisien, hanya membutuhkan DNA dalam jumlah yang

sedang, polimorfik, kemampuan reproduksi baik, informatif, dapat digunakan secara luas, dan tidak perlu mengetahui data sekuen untuk merangkai primer. Sedangkan kekurangan marka ini ialah memerlukan keterampilan yang baik, bersifat dominan, sangat memakan waktu, mahal, dan memerlukan DNA dengan kualitas yang baik (Jonah *et al.*, 2011; Henry, 2013; Bekele and Bekele, 2014; Lateef, 2015). Marka SSR ialah marka dengan pola pengulangan 1-6 nukleotida yang ditemukan dalam jumlah yang banyak pada genom inti pada hampir seluruh taksa (Idrees and Irshad, 2014). Kelebihan marka ini ialah bersifat kodominan, kemampuan reproduksi tinggi, tersebar secara banyak pada genom, dapat digunakan lintas spesies dan genus, polimorfik, serta tidak memerlukan DNA dalam jumlah dan kualitas yang tinggi. Sedangkan kelemahan marka ini ialah perlu biaya pengembangan yang besar, dan terdapat kemungkinan mutasi pada situs penempelan primer yang dapat mengganggu proses amplifikasi (Bekele and Bekele, 2014; Nadeem *et al.*, 2017).

2.3 Aplikasi Teknologi Marka dalam Kegiatan Pemuliaan Kedelai

Teknologi marka telah banyak digunakan dalam kegiatan pemuliaan tanaman. Dengan adanya teknologi marka, pekerjaan yang dilakukan dalam tahapan pemuliaan tanaman menjadi lebih efektif (Lateef, 2015). Pada tanaman kedelai, telah digunakan berbagai marka yang menunjang kegiatan pemuliaan tanaman. Salah satunya ialah penelitian menggunakan marka SSR dan SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) untuk mengidentifikasi gen toleran salin pada kedelai liar. Hasilnya, gen *GmCHXI* yang terdapat pada 388 Kb diduga merupakan gen potensial toleran kondisi salin (Qi *et al.*, 2014). Marka RAPD juga dapat digunakan dalam menduga gen toleran cekaman salin pada kedelai (Khan *et al.*, 2013). Hasilnya, dari 10 genotipe kedelai, terdapat satu genotipe yang dinyatakan tahan terhadap salinitas, yaitu genotipe Pusa-37.

Penelitian lain, menggunakan marka SSR untuk mencari jarak genetik antara kedelai mutan yang memiliki sifat toleran kekeringan terbaik dengan tetuanya, yaitu varietas Panderman dan varietas nasional Muria. Dari penelitian tersebut, terdapat dua galur mutan (Kdl3 dan Kdl 8) yang memiliki sifat toleran kekeringan paling baik daripada galur-galur mutan lain dan juga tetuanya. Akses

yang diuji memiliki jarak genetik yang luas, dan terdapat 20 lokus SSR yang mampu membedakan galur mutan dengan tetuanya (Yuliasti dan Reflinur, 2017).

Analisis keragaman genetik kedelai juga telah dilakukan dengan menggunakan marka SSR. Hasilnya, pada 50 aksesori kedelai yang diuji, terdapat empat lokus (Sct028, Satt002, Satt005, dan Satt571) dengan nilai *Polymorphism Information Content* (PIC) tinggi (>0.75) yang dapat digunakan untuk membedakan antar aksesori. 50 aksesori kedelai juga mengelompok menjadi 10 kluster yang tidak berkaitan dengan asal geografi, varietas, maupun morfologinya. Hal ini diduga disebabkan karena terbatasnya aksesori plasma nutfah kedelai dan marka SSR yang dianalisis, sehingga tidak dapat mencerminkan keragaman genetik yang ada, serta disebabkan karena pemilihan aksesori secara acak, tidak terikat dengan karakter tertentu (Chaerani *et al.*, 2011). Selain marka SSR, marka AFLP juga digunakan untuk mengetahui keragaman genetik pada 9 kultivar kedelai dari Russia dan 2 kultivar dari Polandia dan Swedia (Zargar *et al.*, 2017). Hasilnya, keragaman genetik yang diperoleh ialah sedikit. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kedelai-kedelai tersebut adalah subspecies yang sama, yaitu subspecies *manshurica*. Selain itu, beberapa varietas diduga memiliki tetua yang sama.

Marka SSR juga dapat digunakan dalam analisis keragaman genotipik dan fenotipik kedelai. Penelitian yang dilakukan pada 48 aksesori kedelai introduksi asal China menggunakan 15 marka SSR dapat mengelompokkan kedelai-kedelai tersebut berdasarkan asal provinsinya (Terryana *et al.*, 2017). Penggunaan marka SSR juga merambah pada kegiatan pemetaan gen pada tanaman kedelai. Gen yang berhasil dipetakan ialah gen pengendali waktu berbunga dan waktu polong masak. Marka-marka SSR yang terkait dengan QTL mayor pengendali umur dan sensitivitas terhadap fotoperiodisitas ini sangat berpotensi untuk digunakan pada program pemuliaan menggunakan teknologi *Marker Assisted Selection* (MAS) (Tasma, 2013).

3. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dengan dua tahapan, yaitu tahap persilangan dan tahap verifikasi tanaman F1 putatif menggunakan marka SSR.

3.1 Persilangan Tanaman Kedelai

3.1.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di rumah kaca Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor pada bulan November 2018 hingga bulan Maret 2019.

3.1.2 Bahan dan Alat

Kegiatan penanaman menggunakan bahan-bahan yang meliputi kedelai varietas Grobogan, Biosoy 1, dan 3 aksesori introduksi asal Amerika Serikat, yaitu PI 553045, PI 471938, dan PI 471931 (selanjutnya disebut berturut-turut sebagai Introduksi 10, Introduksi 12, dan Introduksi 13) (Tabel 2), tanah, pupuk organik kotoran sapi “Karyana”, kapur dolomit, pupuk NPK 16-16-20, gandasil D, gandasil B, dan insektisida Decis. Sedangkan alat yang digunakan pada saat penanaman yaitu pot plastik 10 kg dan cetok. Setelah bunga muncul, kegiatan selanjutnya ialah persilangan tanaman. Pada kegiatan persilangan tanaman kedelai, bahan yang digunakan antara lain, bunga kedelai sebagai tetua betina dan tetua jantan, kertas label, benang jahit, dan tali rafia. Sedangkan alat yang digunakan ialah pinset.

Tabel 2. Aksesori Introduksi asal Amerika Serikat

No.	Nama Aksesori	Nama	Deskripsi	Warna Bunga
1.	PI 553045	Cook	Toleran Cekaman Al	Ungu
2.	PI471938	220024	Toleran Cekaman Kekeringan	Ungu
3.	PI471931	220020	Toleran Cekaman Kekeringan dan Banjir	Putih

Sumber: SIP-Mentan No.31/Kpts/PI.800/H/01/2017.SIP

3.1.3 Metode Penanaman Benih Tetua Kedelai

Sebelum kegiatan persilangan dilakukan, benih tetua kedelai ditanam terlebih dahulu. Benih kedelai Grobogan, Biosoy 1, Introduksi 10, Introduksi 12, dan Introduksi 13 ditanam dalam pot yang berisi 10 kg tanah lalu ditambahkan dengan pupuk organik kotoran sapi “Karyana” sebanyak 100 g/pot. Satu minggu sebelum penanaman benih, kapur dolomit diaplikasikan sebanyak 20 g/pot.

Kemudian, sebanyak 2 benih ditanam pada tiap pot (Tasma dan Warsun, 2008). Penanaman tetua dilakukan dengan menyesuaikan umur berbunga tiap tetua (Tabel 3). Jadwal penanaman tetua yang telah dilaksanakan, disajikan dalam Tabel 4. Perawatan tanaman kedelai dilakukan dengan pengaplikasian pupuk NPK 16-16-20 sebanyak 3 g/pot pada saat tanaman berumur 14 hst, Gandasil D sebanyak 0,5 g l⁻¹ yang diaplikasikan selama umur tanaman mencapai 14 hst hingga tanaman berbunga, Gandasil B sebanyak 0,5 g l⁻¹ yang diaplikasikan 10-12 kali setiap minggu, dan insektisida Decis sebanyak 0,5 – 1 ml l⁻¹ yang diaplikasikan sejak tanaman berumur 14 hst.

Tabel 3. Umur Berbunga Tetua Kedelai

Genotype	Umur Berbunga (hst)
Grobogan	30
Biosoy 1	33
Introduksi 10	30
Introduksi 12	30
Introduksi 13	30

Tabel 4. Jadwal Penanaman Tetua Kedelai

No.	Genotype	Tanggal Penanaman
1.	Introduksi 10	13 November 2018
2.	Introduksi 12	13 November 2018
3.	Introduksi 13	13 November 2018
4.	Biosoy 1	13 November 2018
5.	Grobogan	15 November 2018
6.	Biosoy 1	15 November 2018
7.	Grobogan	17 November 2018
8.	Introduksi 10	21 November 2018
9.	Introduksi 12	21 November 2018
10.	Introduksi 13	21 November 2018
11.	Biosoy 1	21 November 2018
12.	Grobogan	23 November 2018
13.	Biosoy 1	23 November 2018
14.	Grobogan	25 November 2018

3.1.4 Metode Persilangan

Setelah tanaman berbunga, dilakukan persilangan untuk membentuk F1, yaitu Grobogan x Introduksi 10, Grobogan x Introduksi 12, Grobogan x Introduksi 13, Biosoy 1 x Introduksi 10, Biosoy 1 x Introduksi 12, dan Biosoy 1 x Introduksi 13 (Tabel 5). Persilangan dilakukan dengan menyesuaikan masa anthesis dan resptif bunga kedelai. Masa resptif dan anthesis bunga kedelai ialah

pada pukul 05.30 hingga pukul 09.30 (Arifianto *et al.*, 2015). Apabila kegiatan persilangan dilakukan terlalu siang, maka tepung sari dikhawatirkan mengering dan menempel pada kepala putik. Persilangan dilakukan setelah muncul bunga pada tanaman. Bunga yang digunakan sebagai tetua betina ialah bunga yang belum mekar, yang masih tertutup oleh kelopak, namun bagian mahkotanya sudah muncul. Kuncup pada 5 hari pertama umumnya lebih baik digunakan dalam persilangan karena ukurannya lebih besar. Selain itu bunga pada batang utama juga lebih baik digunakan untuk persilangan daripada bunga pada cabang. Kegiatan persilangan diawali dengan kastrasi pada bunga betina. Mahkota bunga yang masih kuncup dibuka perlahan, kemudian tangkai sari dibuang dan menyisakan kepala putik saja. Selanjutnya, dilakukan kegiatan penyerbukan. Tepung sari dari bunga jantan yang sudah mekar dan masih segar ditempelkan pada kepala putik. Kemudian bunga betina diberi tanda dengan menggunakan benang jahit untuk membedakan antara polong hasil persilangan dengan polong hasil penyerbukan sendiri. Untuk mengantisipasi kegagalan persilangan, maka jumlah bunga yang disilangkan harus banyak (Kartono, 2005).

Tabel 5. Populasi Persilangan Kedelai

No.	Tetua Betina	Tetua Jantan
1.	Grobogan	Introduksi 10
2.	Grobogan	Introduksi 12
3.	Grobogan	Introduksi 13
4.	Biosoy 1	Introduksi 10
5.	Biosoy 1	Introduksi 12
6.	Biosoy 1	Introduksi 13

Benih F1 hasil persilangan kemudian ditanam kembali sesuai dengan prosedur yang telah ditetapkan untuk dilanjutkan pada tahapan verifikasi tanaman F1 putatif menggunakan marka SSR.

3.1.5 Variabel Pengamatan dan Analisa Statistik

Variabel pengamatan pada tahapan ini ialah jumlah bunga yang disilangkan, jumlah polong yang dihasilkan, dan persentase keberhasilan persilangan.

a. Jumlah bunga yang disilangkan

Jumlah bunga yang disilangkan diamati dengan menghitung langsung keseluruhan jumlah bunga betina yang disilangkan dalam satu tanaman pada

tiap genotipe tanaman. Sehingga jumlah bunga yang disilangkan dihitung dengan satuan bunga per tanaman.

b. Jumlah polong hasil persilangan yang dihasilkan

Jumlah polong hasil persilangan yang dihasilkan diamati dengan menghitung langsung keseluruhan polong kering yang ditandai dengan adanya benang jahit pada polong dalam satu tanaman pada tiap genotipe tanaman. Sehingga jumlah polong yang dihasilkan dihitung dengan satuan polong per tanaman.

c. Persentase keberhasilan persilangan

Persentase keberhasilan persilangan dihitung dengan menggunakan rumus

$$\text{Persentase keberhasilan} = \frac{\Sigma \text{ polong hasil persilangan yang dihasilkan}}{\Sigma \text{ bunga yang disilangkan}} \times 100\%$$

Data variabel pengamatan kemudian disajikan dengan menggunakan tabel untuk menggambarkan keragaman yang terdapat pada variabel-variabel tersebut.

3.2 Verifikasi Tanaman F1 Putatif menggunakan Marka SSR

3.2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor pada bulan Februari hingga bulan Maret 2019.

3.2.2 Bahan dan Alat

Pada kegiatan verifikasi tanaman F1 putatif menggunakan marka SSR, bahan yang digunakan yaitu sampel daun segar kedelai, PVP 2%, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), natrium bisulfit 0,38%, natrium asetat (NaOAc) 3M, kloroform isoamilalkohol 24:1, isopropanol, etanol 70%, buffer Tris-EDTA (TE) 1x pH 8.0, KAPA2G *Fast ReadyMix PCR Kit* yang terdiri atas KAPA2G *Fast DNA Polymerase* dalam buffer reaksi (dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, *stabilizer*, dan *tracking dye*), ddH₂O, gel agarose, buffer Tris Asetat EDTA (TAE) 1x pH 8.0, SYBR *Gold Nucleic Acid Gel Stain*, 1 kb DNA *Ladder*, *molecular water* (MW), *Loading dye*, 20 primer SATT untuk SSR-PCR, akrilamid-bisakrilamid 8%, *Ammonium Persulfate* (APS) 10%, TEMED, *Mix electrophoresis*, marker 1 kb, buffer Tris Borate EDTA (TBE) 1x pH 8.0, tube 1.5 ml, tube 2 ml, dan tisu KimWipes. Sedangkan alat yang digunakan antara lain *blue pestle*, erlenmeyer, gelas ukur, mikropipet, tips, inkubator, *water bath*,

sentrifuge, *tube rack*, lemari pendingin, Speedvac DNA Concentrator , *96-plate tube*, T1 Thermocycler (PCR), *plate gel agarose*, *plate gel poliakrilamid*, elektroforesis vertikal, elektroforesis horizontal, baki, dan UV Transilluminator.

3.2.3 Metode Isolasi DNA Genomik

Benih F1 putatif ditanam di pot berisi tanah yang diperkaya dengan pupuk kandang sapi merk Karyana, dengan 2 benih tiap pot. Pada umur 14 hari setelah tanam, setiap tanaman F1 dilabeli, dan diambil daun mudanya untuk dilakukan isolasi DNA. Daun yang diambil ialah daun *trifoliolate* pada tanaman kedelai yang memiliki posisi saling berhadapan. Daun selanjutnya dimasukkan ke dalam tube 2 ml. Kemudian tube ditambahkan dengan 800 μ l buffer ekstraksi (2% (w/v) *cethyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB), 100 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl), 2% (w/v) *Polyvinyl Pyrrolidone* (PVP), dan 0,4% (w/v) natrium disulfit), lalu digerus menggunakan *blue pestle*. Setelah digerus, tube diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit, dengan membolak-balik tube setiap 5 menit. Selanjutnya, tube ditambahkan dengan *chloroform isoamyl alcohol* 24:1 (chisam) sebanyak 800 μ l, lalu dihomogenkan dengan cara dibolak-balik selama 5 menit. Tube selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 20°C. Sebanyak 600 μ l supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tube 1.5 ml yang baru, lalu ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak 1x volume supernatan, dan 3 M natrium asetat sebanyak 1/10 volume supernatan. Kemudian tube dibolak-balikkan agar homogen. Setelah itu, tube diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, dan dibolak-balik sebentar.

Tube kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 20°C. Hasil sentrifugasi berupa supernatan dan pellet. Supernatan yang terbentuk dibuang, kemudian pellet dibilas dengan menambahkan 500 μ l etanol 70% (v/v) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Sampel lalu disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 20°C. Supernatan kemudian dibuang, dan pellet dikeringkan menggunakan alat Speedvac DNA Concentrator selama 8-9 menit. Pellet yang telah kering kemudian dilarutkan menggunakan buffer 1x TE (Tris HCl pH 8.0, EDTA pH 8.0) sebanyak 100 μ l, lalu diinkubasi pada suhu 65°C sambil dilakukan *tapping* perlahan setiap 5

menit. Setelah itu DNA siap untuk diuji kualitas dan kuantitasnya (Doyle and Doyle, 1990).

3.2.4 Metode Uji Kualitatif DNA

Sebanyak 3 μl DNA dicampur dengan 5 μl *mix loading* buffer elektroforesis (1 μl *loading dye* SYBR Gold 6x, 0.5 μl TE 1x, dan 1.5 μl MQ water). Setelah tercampur, DNA diinjeksikan ke dalam *well* pada gel agarose 1% (1 g agarose dicampur dengan 100 ml buffer TAE 1x). Alat elektroforesis lalu dihubungkan dengan *power supply* yang dialiri listrik dengan tegangan 90 v selama 1 jam. Hasil elektroforesis divisualisasikan menggunakan UV Transilluminator.

3.2.5 Metode Uji Kuantitatif DNA

Pengujian kuantitas DNA menggunakan alat NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermoscientific, USA). Sebanyak 2 μl buffer TE diletakkan pada bagian pedestal NanoDrop untuk melakukan perhitungan blanko nilai $A_{260/280}$. Setelah perhitungan blanko selesai, pedestal dibersihkan dengan tisu KimWipes. Kemudian sebanyak 2 μl DNA diletakkan pada pedestal, dan dilakukan perhitungan kembali untuk mendapatkan nilai konsentrasi DNA, dan rasio $A_{260/280}$ sampel (Desjardins and Conklin, 2010).

3.2.6 Metode PCR SSR

Setiap sampel diamplifikasi dengan menggunakan 15 pasang primer SSR (Tabel 6). Total reaksi yang digunakan tiap sampel ialah 10 μl yang terdiri atas 2 μl DNA template, 1 μl marka (mengandung 0.5 μl marka *forward*, 0.5 μl marka *reverse*), 5 μl KAPA2G *Fast ReadyMix* (mengandung buffer 10 x, dNTP *mix* 10 mM, enzim DNA *Taq polymerase* 0.5 U/ μl , MgCl 1.5 mM) (KAPA Biosystem, USA), dan 2 μl ddH₂O. Kegiatan PCR dilakukan dengan mesin T1 Thermocycler (Biometra, Germany) dengan profil sebagai berikut: tahap denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti dengan 35 siklus tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, tahap *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, tahap *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extension* pada suhu 60°C selama 5 menit (Terryana *et al.*, 2017).

Tabel 6. Daftar Primer Marka SSR yang Digunakan pada Penelitian ini

Primer	Sequence (5' → 3')	Product Size (bp)	Motif
satt030	F: AAAAAGTGAACCAAGCC R: TCTTAAATCTTATGTTGATGC	164	(ATA)21
satt045	F: TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT R: ATGCCTCTCCCTCCT	139	(AAT)18
satt038	F: GGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT R: GGCATTGAAATGGTTTTAGTCA	176	(ATA)17
satt308	F: GCGTTAAGGTTGGCAGGGTGGAAAGTG R: GCGCAGCTTTATACAAAAATCAACAA	170	(TTA)22
satt431	F: GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA R: GCGCACGAAAGTTTTTCTGTAACA	230	(AAT)21
satt063	F: AAATGATTAACAATGTTTATGAT R: ACTTGCATCAGTTAATAACAA	144	(TAA)20
satt197	F: CACTGCTTTTTCCCTCTCT R: AAGATACCCCAACATTATTTGTAA	173	(ATT)20
satt147	F: CCATCCCTTCTCCAATAGAT R: CTCCACACCCTAGTTTGTGACAA	172	(ATA)15
satt191	F: CGCGATCATGTCTCTG R: GGGAGTTGGTGTTCCTGTG	226	(TAT)19
satt463	F: TTGGATCTCATATTCAAACCTTCAAG R: CTGCAAATTTGATGCACATGTGTCTA	221	(AAT)13(GAT)17(AAT)19
satt114	F: GGGTTATCCTCCCAATA R: ATATGGGATGATAAGGTGAAA	108	(AAT)17
satt009	F: CCAACTTGAAATTACTAGAGAAA R: CTTACTAGCGTATTAACCCTT	162	(AAAT)3(AAT)13
sat_140	F: GCGCCATGAAATTATTTGGCAAGTATT R: GCGGTTGAAGAATGGAACTAAAAATG	205	(AT)28
satt646	F: GCGGGTATGAATTAATTAATGTAGAAT R: GCGCCTTCAAAAACTAATGACATATCAT	199	(TTA)11
satt194	F: GGGCCCAACTGATATTTAATTGTAA R: GCGCTTTGTGTTCCGATTTTGTAT	246	(ATT)4GAGTAAATAG(TA)5

Sumber: (Grant *et al.*, 2010)

3.2.7 Metode Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Sebelum melakukan pembuatan gel poliakrilamid, *gel plate*, *spacer*, dan *comb* dicuci dengan menggunakan etanol 70%, lalu dirangkai. Gel poliakrilamid dibuat dengan mencampurkan 50 ml gel akrilamid-bis akrilamid 8% dengan 500 μ l *ammonium persulfate* 10% (APS), dan 50 μ l TEMED. Larutan kemudian segera dituangkan pada *plate* yang telah dirangkai. Gel didiamkan selama \pm 30 menit hingga memadat. Lalu sampel yang telah di PCR dicampur dengan *mix electrophoresis* terlebih dahulu, dan diinjeksikan ke dalam *well* pada gel poliakrilamid. Selanjutnya, gel yang telah berisi sampel dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis horizontal, dan ditambahkan dengan buffer TBE 1x. Terakhir, tangki elektroforesis dihubungkan pada *power supply* yang dialiri tegangan 100 v selama 90 menit.

3.2.8 Visualisasi Hasil Elektroforesis

Gel poliakrilamid hasil elektroforesis direndam dalam aquades untuk melepas gel dari *plate*. Gel dilepas dari *plate* secara hati-hati agar gel tidak patah. Selanjutnya, gel divisualisasi dengan menggunakan alat UV Transilluminator (Biorad, USA).

3.2.9 Variabel Pengamatan dan Analisa Statistik Pola Pita DNA

Variabel pengamatan pada tahapan ini ialah ada tidaknya pita DNA yang terbentuk pada visualisasi gel poliakrilamid. Analisa statistik yang digunakan pada tahap ini ialah Analisa Statistik Deskriptif yang dilakukan dengan cara melakukan survei marka polimorfik pada tetua persilangan. Selanjutnya, dipilih dua marka polimorfik yang menunjukkan pita cukup tebal dan pola polimorfisme yang jelas lalu digunakan untuk verifikasi tanaman F1 hasil persilangan. Tanaman yang terverifikasi positif sebagai tanaman F1 persilangan (*true F1 plant*) ialah tanaman yang memiliki pola pita DNA heterozigot, yang ditandai dengan adanya pita marka SSR yang berasal dari kedua tetua (Tasma dan Warsun, 2009).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Persilangan Tanaman Kedelai

Kegiatan persilangan dari dua tetua betina dan tiga tetua jantan menghasilkan enam populasi F1 putatif. Tiap-tiap populasi diamati beberapa parameter, seperti jumlah bunga disilangkan, jumlah polong dihasilkan, jumlah biji dihasilkan, rerata biji per polong, dan persentase keberhasilan persilangan. Dari kegiatan persilangan yang telah dilaksanakan, didapatkan hasil yang disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Pembentukan F1 Putatif Hasil Persilangan

Populasi F1 Putatif	Jumlah bunga disilangkan	Jumlah polong dihasilkan	Jumlah biji dihasilkan	Rerata biji per polong	Persentase keberhasilan persilangan (%)
Grobogan x Introduksi 10	70	28	51	1.82	40
Grobogan x Introduksi 12	37	17	32	1.88	45.95
Grobogan x Introduksi 13	70	32	55	1.72	45.71
Biosoy 1 x Introduksi 10	41	9	17	1.89	21.95
Biosoy 1 x Introduksi 12	49	12	17	1.42	24.49
Biosoy 1 x Introduksi 13	85	9	19	2.11	10.59

Persilangan dilakukan untuk membentuk 6 populasi F1 putatif. Dari keseluruhan populasi, populasi Biosoy 1 x 13 memiliki jumlah bunga yang disilangkan paling tinggi, yaitu sebanyak 85 bunga. Bunga yang dihasilkan oleh kedua tetua betina memiliki perbedaan, terutama pada ukuran bunga. Bunga Grobogan memiliki ukuran yang lebih besar daripada bunga Biosoy 1 (Gambar 1). Selain itu, pembungaan Grobogan cenderung lebih serempak dibandingkan dengan pembungaan Biosoy 1.



Gambar 1. Perbandingan Ukuran Bunga Grobogan dan Biosoy 1

Jumlah polong dihitung dari banyaknya polong kering hasil persilangan yang dipanen pada tiap populasi. Jumlah polong terbanyak terdapat pada populasi Grobogan x 13, sebanyak 32 polong. Populasi ini juga memiliki jumlah biji terbanyak pula, yaitu sebanyak 55 biji. Rerata jumlah biji per polong terbanyak terdapat pada populasi Biosoy 1 x 13 dengan nilai 2.11 biji per polong. Dari keseluruhan populasi, persentase keberhasilan persilangan tertinggi terdapat pada populasi Grobogan x 12 dengan nilai 45.95%, sedangkan persentase keberhasilan persilangan terendah terdapat pada populasi Biosoy 1 x 13 yang hanya memiliki nilai sebesar 10.59%.

4.1.2 Verifikasi Tanaman F1 Putatif menggunakan Marka SSR

4.1.2.1. Isolasi DNA Genomik dan Uji Kuantitatif DNA

Sebanyak 12 benih F1 putatif dari tiap-tiap populasi ditanam kembali pada pot. Setelah berumur 14 hst, dilakukan pengambilan sampel daun untuk isolasi DNA genomik. Daun yang digunakan ialah daun muda dan dalam kondisi segar. Pada saat pengambilan sampel, tidak seluruh tanaman tumbuh. Sehingga, jumlah sampel yang diuji ditentukan oleh banyaknya tanaman yang tumbuh. Setelah dilakukan isolasi DNA genomik, setiap sampel diuji kuantitas dan kualitasnya. Uji kuantitas DNA dilakukan dengan menggunakan NanoDrop Spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific, USA). Hasil uji kuantitas DNA disajikan dalam Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji Kuantitatif DNA menggunakan Spektrofotometer NanoDrop

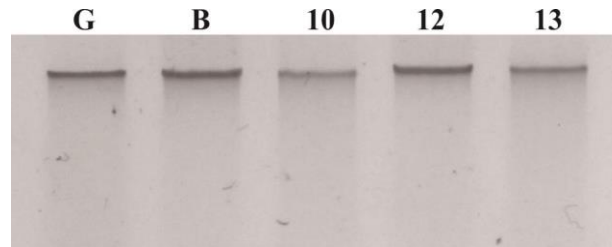
Nomor	Nama	Konsentrasi DNA (ng μl^{-1})	260/280
1	Introduksi 10	445,6	2,1
2	Introduksi 12	301,1	2,1
3	Introduksi 13	145,8	2,1
4	Biosoy 1	116,2	2,1
5	Grobogan	123,8	2,1
6	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-1	595,8	2,1
7	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-2	708,7	2,1
8	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-3	710,5	2,2
9	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-4	292,1	2,1
10	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-5	168	1,9
11	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-6	597,1	2,1
12	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-7	588,2	2,1
13	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-8	588,8	2,1
14	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-9	568,2	2,1
15	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-10	734,7	2,1
16	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-11	307,3	2,1
17	F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-12	594,3	2,1
18	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-1	1329,8	2,1
19	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-2	2956,3	2,1
20	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-3	929	2,1
21	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-4	1804,5	2,1
22	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-5	855,9	2,1
23	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-6	1378,3	2,1
24	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-7	731	2,1
25	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-8	186,8	2,1
26	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-9	554,2	2,1
27	F1 Biosoy 1 x Introduksi 12-10	642,2	2,1
28	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-1	760,6	2,0
29	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-2	1941,5	2,0
30	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-3	1133,6	2,1
31	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-4	2502,2	2,0
32	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-5	3470,1	2,1
33	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-6	1706,6	2,1
34	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-7	1712,9	2,1
35	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-8	1971,1	2,0
36	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-9	1142,4	2,1
37	F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-10	1975,8	2,1
38	F1 Grobogan x Introduksi 10-1	490,2	2,1
39	F1 Grobogan x Introduksi 10-2	451,3	2,1
40	F1 Grobogan x Introduksi 10-3	509,7	2,1
41	F1 Grobogan x Introduksi 10-4	470,2	2,1
42	F1 Grobogan x Introduksi 10-5	360,5	2,1
43	F1 Grobogan x Introduksi 10-6	641,5	2,0
44	F1 Grobogan x Introduksi 10-7	414,7	2,1
45	F1 Grobogan x Introduksi 10-8	337,2	2,1
46	F1 Grobogan x Introduksi 10-9	1843,9	2,1
47	F1 Grobogan x Introduksi 10-10	1165,3	2,1
48	F1 Grobogan x Introduksi 10-11	612,4	2,0
49	F1 Grobogan x Introduksi 12-1	228,1	2,1
50	F1 Grobogan x Introduksi 12-2	591,9	2,0

Nomor	Nama	Konsentrasi DNA (ng μl^{-1})	260/280
51	F1 Grobogan x Introduksi 12-3	382	2,1
52	F1 Grobogan x Introduksi 12-4	676,8	2,0
53	F1 Grobogan x Introduksi 12-5	774,3	2,1
54	F1 Grobogan x Introduksi 12-6	747,4	2,1
55	F1 Grobogan x Introduksi 12-7	354,1	2,1
56	F1 Grobogan x Introduksi 12-8	451,5	2,1
57	F1 Grobogan x Introduksi 12-9	384	2,1
58	F1 Grobogan x Introduksi 12-10	337,1	2,1
59	F1 Grobogan x Introduksi 12-11	664,5	2,1
60	F1 Grobogan x Introduksi 13-1	978,4	2,1
61	F1 Grobogan x Introduksi 13-2	719,2	1,7
62	F1 Grobogan x Introduksi 13-3	435,5	2,1
63	F1 Grobogan x Introduksi 13-4	463,7	2,1
64	F1 Grobogan x Introduksi 13-5	785,7	2,1
65	F1 Grobogan x Introduksi 13-6	743	2,0
66	F1 Grobogan x Introduksi 13-7	733,3	2,1
67	F1 Grobogan x Introduksi 13-8	429,3	2,0
68	F1 Grobogan x Introduksi 13-9	662,1	2,1
69	F1 Grobogan x Introduksi 13-10	418,9	2,1
70	F1 Grobogan x Introduksi 13-11	1495,1	2,1

Hasil pengukuran kuantitas DNA menunjukkan bahwa dari 70 sampel yang diuji, sampel F1 Biosoy 1 x Introduksi 13-5 memiliki konsentrasi DNA tertinggi, yaitu sebanyak 3470,1 ng/ μl . Sedangkan konsentrasi DNA terendah terdapat pada sampel tetua Biosoy 1, dengan nilai 116,2 ng/ μl . Nilai kemurnian DNA dihitung berdasarkan rasio A_{260}/A_{280} . Nilai kemurnian DNA paling tinggi (2,2) terdapat pada sampel F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-3, sedangkan nilai kemurnian terendah (1,7) terdapat pada sampel F1 Grobogan x Introduksi 13-2.

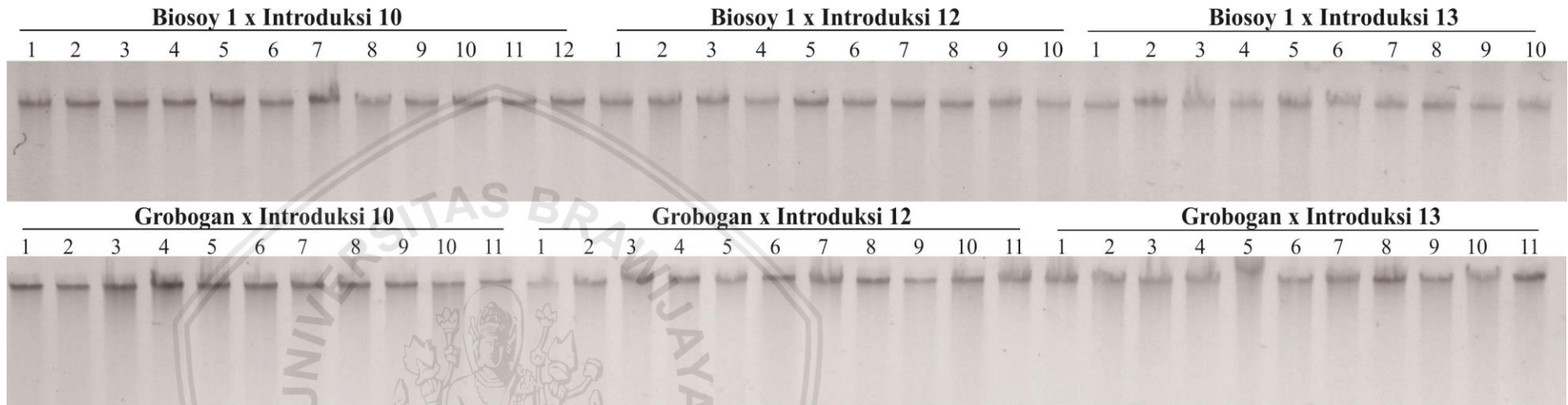
4.1.2.2. Uji Kualitatif DNA

DNA tiap sampel selanjutnya diuji kualitasnya menggunakan teknik elektroforesis horizontal menggunakan agarose 1%. Sebelum DNA diinjeksikan ke dalam *well* agarose, DNA dicampur terlebih dahulu dengan larutan *mix elektroforesis*. Hasil uji kualitatif sampel DNA tetua dan F1 terdapat pada Gambar (1 dan 2) di bawah ini.



Keterangan: G = Grobogan, B = Biosoy 1, 10 = Introduksi 10, 12 = Introduksi 12, 13 = Introduksi 13

Gambar 2. Hasil Uji Kualitatif DNA Tetua



Keterangan: Nomor-nomor menunjukkan sampel-sampel F1 putatif hasil persilangan pada tiap-tiap kombinasi persilangan

Gambar 3. Hasil Uji Kualitatif DNA Sampel Tanaman F1 Putatif

Hasil uji kualitatif DNA menunjukkan bahwa keseluruhan pita DNA dalam kondisi tebal dan jelas. Pita DNA dalam kondisi tebal dan jelas menandakan bahwa DNA memiliki kualitas yang baik. DNA genom kedelai terletak di dekat *well* agarose, menandakan bahwa DNA genom kedelai memiliki ukuran yang cukup besar. Setelah DNA diuji kuantitas dan kualitasnya, DNA stok diencerkan dengan menambahkan ddH₂O, hingga konsentrasinya menjadi 20 ng/μl sebelum masuk ke tahap PCR.

4.1.2.3. Survei Polimorfisme Marka SSR

Analisis molekuler digunakan untuk mengonfirmasi tanaman F1 putatif hasil persilangan dengan teknik PCR menggunakan marka SSR. Sebelum sampel diamplifikasi untuk verifikasi, dilakukan survei primer marka SSR untuk mendapatkan marka SSR yang dapat menunjukkan polimorfisme yang tinggi. Seluruh sampel tetua diamplifikasi dengan 15 pasang primer SSR untuk melihat tingkat polimorfisme diantara kedua tetua. Primer-primer yang dapat membedakan kedua tetua, yang ditandai dengan letak pita DNA antar tetua berada pada posisi yang berbeda disebut dengan primer polimorfik, sedangkan primer yang menghasilkan pita-pita antar tetua yang sejajar (pola pita sama) disebut dengan primer monomorfik. Survei primer SSR polimorfik bertujuan untuk memudahkan proses analisis data saat membandingkan DNA F1 putatif dengan DNA tetua. DNA F1 putatif yang bukan hasil persilangan akan memiliki pola pita marka SSR yang mengikuti salah satu tetuanya, yaitu tetua betina. Sedangkan DNA F1 putatif yang merupakan hasil dari persilangan akan memiliki pola pita marka SSR yang berasal dari kedua tetuanya. Dengan kata lain, tanaman F1 putatif yang positif hasil persilangan akan memiliki pola pita marka SSR gabungan dari tetua jantan dan tetua betina. Oleh karena itu, diperlukan marka SSR dengan polimorfisme yang tinggi agar dapat membedakan tanaman F1 putatif positif hasil persilangan dengan yang bukan hasil persilangan.

Tabel 9. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 10

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt063	
2.	satt197	

Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Sebanyak 15 pasang primer SSR digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 10. Hasilnya, terdapat delapan marka yang polimorfik. Marka-marka polimorfik tersebut diantaranya satt063, satt197, satt147, satt191, satt 463, satt114, satt009, dan satt038. Dari delapan marka, dipilih dua marka yang paling polimorfik, yaitu satt063 dan satt197 (Tabel 9). Kedua primer ini mampu membedakan pita DNA tetua jantan dan betina dengan

jarak letak pita yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Tabel 10. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 12

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt009	
2.	satt431	

Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Dari 15 pasang primer SSR yang digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 12, terdapat empat marka yang polimorfik. Marka-marka polimorfik tersebut diantaranya satt009, satt431, satt147, dan satt038. Dari empat marka tersebut, dipilih dua marka yang paling polimorfik, yaitu satt009 dan satt431 (Tabel 10). Kedua marka ini mampu membedakan pita

DNA tetua jantan dan betina dengan jarak letak pita yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Tabel 11. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Biosoy 1 x Introduksi 13

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt009	
2.	satt431	

Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Sebanyak 15 pasang primer marka SSR digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 13. Hasilnya, terdapat lima marka yang polimorfik. Marka-marka polimorfik tersebut diantaranya satt009, satt431, satt147, satt114, dan satt038. Dari lima marka, dipilih dua marka yang paling

polimorfik, yaitu satt009 dan satt431 (Tabel 11). Kedua marka ini mampu membedakan pita DNA tetua jantan dan betina dengan jarak letak pita yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Tabel 12. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 10

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt009	
2.	satt308	

Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Dari 15 pasang primer marka SSR yang digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Grobogan x Introduksi 10, hanya terdapat dua marka yang polimorfik. Marka polimorfik pada populasi ini adalah satt009 dan satt308

(Tabel 12). Kedua marka ini mampu membedakan pita DNA tetua jantan dan betina dengan jarak letak pita yang cukup jauh (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Tabel 13. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 12

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt009	
2.	satt197	

Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Sebanyak 15 pasang primer SSR yang digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Grobogan x Introduksi 12. Hasilnya terdapat enam marka yang polimorfik. Marka-marka polimorfik tersebut diantaranya satt009,

satt197, satt063, satt191, satt 463 dan satt114. Dari enam marka, dipilih dua marka yang menunjukkan pola polimorfisme paling baik (pita tebal dan jarak antar pita jauh), yaitu satt009 dan satt197 (Tabel 13). Kedua marka ini mampu membedakan pita DNA tetua jantan dan betina dengan jarak letak pita yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Tabel 14. Daftar Primer Marka SSR Polimorfik Terpilih pada Populasi Grobogan x Introduksi 13

No.	Marka	Gambar Pola Pita
1.	satt009	
2.	satt197	

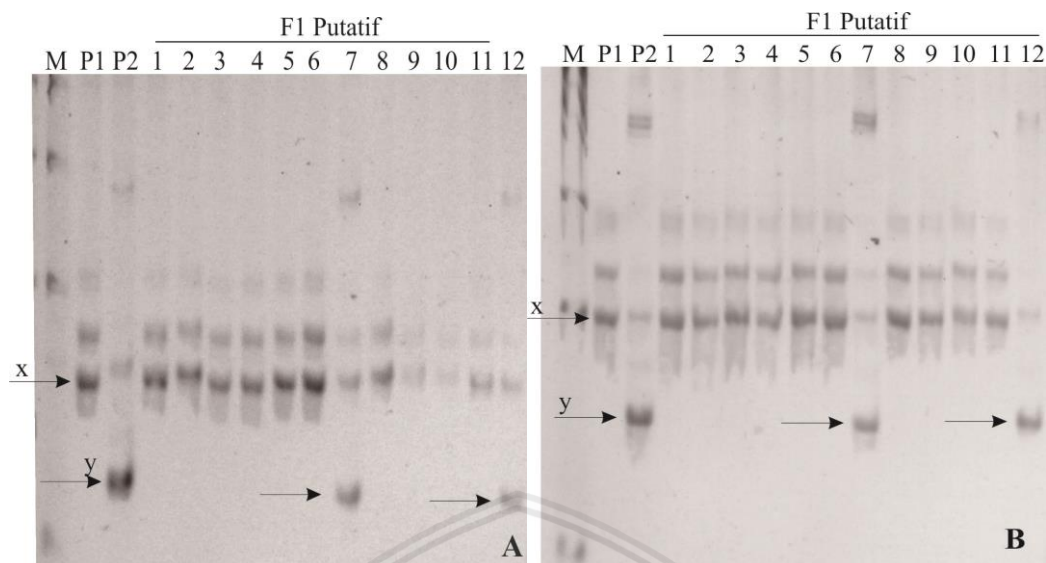
Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; G = Grobogan; 10 = Introduksi 10; 12 = Introduksi 12; 13 = Introduksi 13; dan B = Biosoy 1. Anak panah x menunjukkan pola pita DNA tetua betina, sedangkan anak panah y menunjukkan pola pita DNA tetua jantan. Untuk mempermudah proses verifikasi F1, maka pemilihan primer harus mampu menunjukkan perbedaan jarak antar kedua pita tetua. Primer yang dipilih ialah primer yang polimorfik. Primer disebut polimorfik apabila mampu menunjukkan perbedaan jarak antar pita DNA pada genotipe yang berbeda (kedua tetua).

Dari 15 pasang primer marka SSR yang digunakan untuk survei primer polimorfik pada populasi Grobogan x Introduksi 13, terdapat delapan marka yang polimorfik. Marka-marka polimorfik tersebut diantaranya satt009, satt197, satt063, satt191, satt 463, satt114, satt431, dan satt147. Dari delapan marka, dipilih dua marka yang paling polimorfik, yaitu satt009 dan satt197 (Tabel 14). Kedua marka ini mampu membedakan pita DNA tetua jantan dan betina dengan jarak letak pita yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya (ditunjukkan dengan anak panah pada gambar).

Hasil survei marka menunjukkan bahwa terdapat 5 marka terpilih yang polimorfik. Marka yang dipilih ialah marka yang dapat menunjukkan jarak antar pita DNA yang cukup jauh dibandingkan dengan marka lainnya. Hasil survei juga menunjukkan kecenderungan bahwa marka yang polimorfik pada tetua Introduksi 12 akan polimorfik pula pada tetua Introduksi 13.

4.1.2.4. Verifikasi Tanaman F1 Putatif Hasil Persilangan

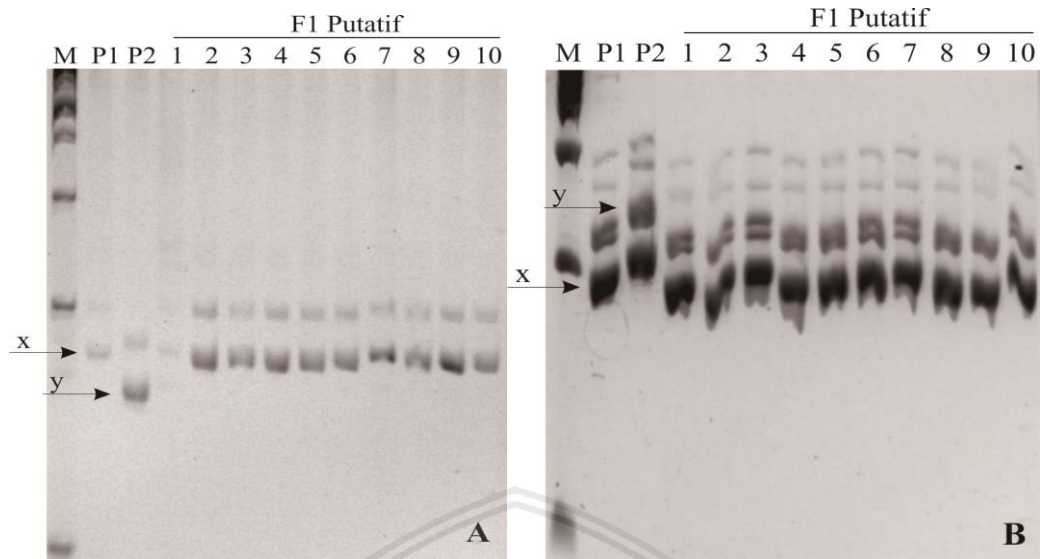
Verifikasi ini bertujuan untuk memastikan individu yang diuji ialah individu hasil persilangan antar tetua. Verifikasi dilakukan dengan menggunakan primer yang telah terpilih dari tahap survei primer polimorfik. Visualisasi hasil elektroforesis akan menunjukkan tanaman yang terverifikasi positif hasil persilangan memiliki pola pita DNA heterozigot, yaitu pola pita marka SSR yang berasal dari kedua tetuanya (tetua betina dan tetua jantan). Tanaman F1 akan selalu memiliki pola pita DNA seperti tetua betina. Hal ini disebabkan karena bagian bunga betina yang digunakan dalam kegiatan persilangan adalah putik, sedangkan bagian bunga jantan yang digunakan hanya serbuk sari saja. Sehingga, apabila tanaman F1 putatif positif sebagai hasil persilangan, maka pola pita DNA yang nampak berupa kombinasi pola pita DNA dari kedua tetua. Sedangkan apabila F1 bukan positif hasil persilangan, maka pola pita yang nampak hanya pola pita dari tetua betina saja.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp, P1 = Biosoy 1; P2 = Introduksi 10. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua jantan ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 4. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi 10 yang diamplifikasi. A) marka satt063 B) marka satt197

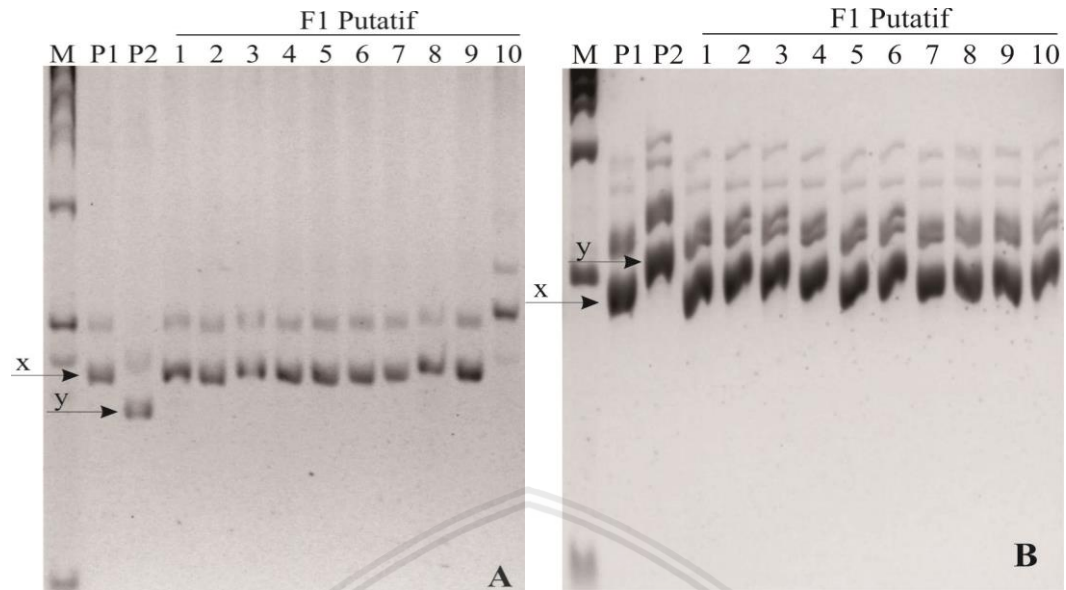
Visualisasi elektroforesis (elektroforegram) F1 putatif hasil persilangan pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 10 ditunjukkan pada Gambar 4. Dari 12 sampel F1 Biosoy 1 x Introduksi 10 putatif yang diuji, terdapat 2 tanaman yang terverifikasi positif hasil persilangan antara Biosoy 1 dan Introduksi 10. Tanaman yang terverifikasi positif, memiliki pola pita heterozigot yang berasal dari kedua tetua, seperti yang terdapat pada sampel F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-7 dan F1 Biosoy 1 x Introduksi 10-12. Kedua marka yang digunakan untuk mengamplifikasi populasi Biosoy 1 x Introduksi 10 berhasil menunjukkan hasil yang sama bahwa terdapat dua individu yang terverifikasi positif hasil persilangan antara Biosoy 1 x Introduksi 10.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp, P1 = Biosoy 1; P2 = Introduksi 12. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua jantan ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 5. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi 12 yang diamplifikasi. A) marka satt009 B) marka satt431

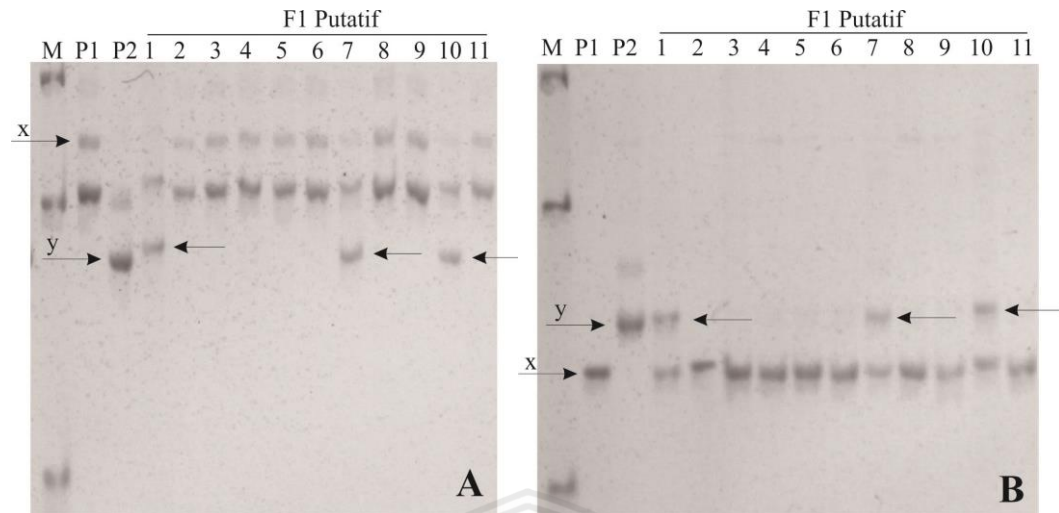
Elektroforegram F1 putatif hasil persilangan pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 12 ditunjukkan pada Gambar 5. Dari 10 sampel F1 Biosoy 1 x Introduksi 12 putatif yang diuji, tidak ada sampel yang terverifikasi positif sebagai tanaman hasil persilangan. Populasi Biosoy 1 x Introduksi 12 tidak menunjukkan adanya sampel yang memiliki pola pita heterozigot yang berasal dari gabungan pola pita DNA kedua tetua. Pola pita DNA yang terbentuk pada sampel F1 pada populasi ini hanya menghasilkan pola pita monomorfik, dan menyerupai pola pita DNA tetua betina. Kedua marka yang digunakan untuk mengamplifikasi populasi ini tidak berhasil memverifikasi tanaman positif hasil persilangan antara F1 Biosoy 1 x Introduksi.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp, P1 = Biosoy 1; P2 = Introduksi 13. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua betina ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 6. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Biosoy 1 x Introduksi 13 yang diamplifikasi. A) marka satt009 B) marka satt431

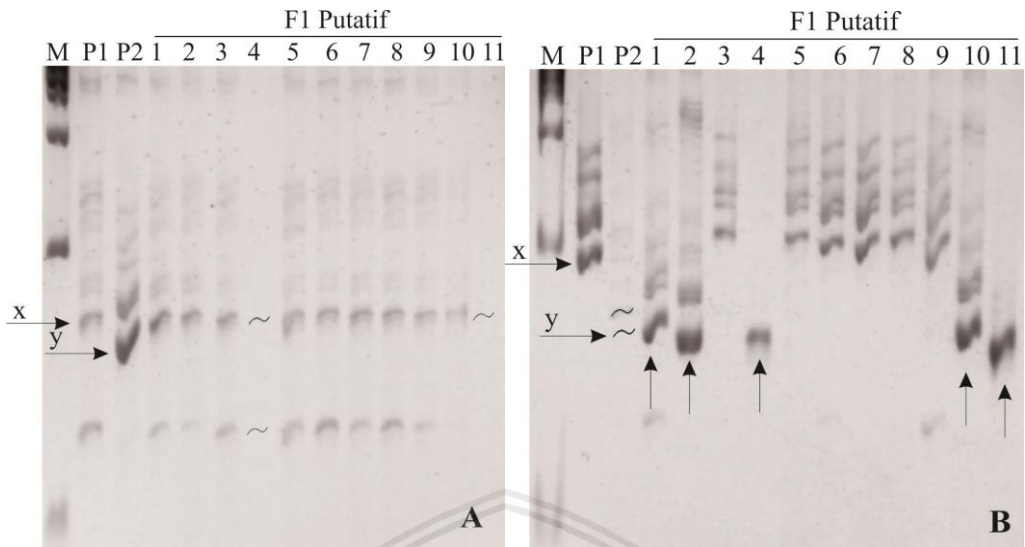
Elektroforegram F1 putatif hasil persilangan pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 13 ditunjukkan pada Gambar 6. Dari 10 sampel yang diuji, tidak ada sampel yang terverifikasi positif sebagai hasil dari persilangan. Populasi ini tidak menunjukkan adanya sampel yang memiliki pola pita heterozigot yang berasal dari gabungan pola pita DNA kedua tetua. Kedua marka yang digunakan untuk mengamplifikasi populasi ini tidak berhasil mengonfirmasi tanaman positif hasil persilangan antara F1 Biosoy 1 x Introduksi 13, karena hanya menghasilkan pola pita homozigot, mengikuti tetua betina.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp; P1 = Grobogan; P2 = Introduksi 10. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua jantan ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 7. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi 10 yang diamplifikasi menggunakan A) marka satt009 B) marka satt308

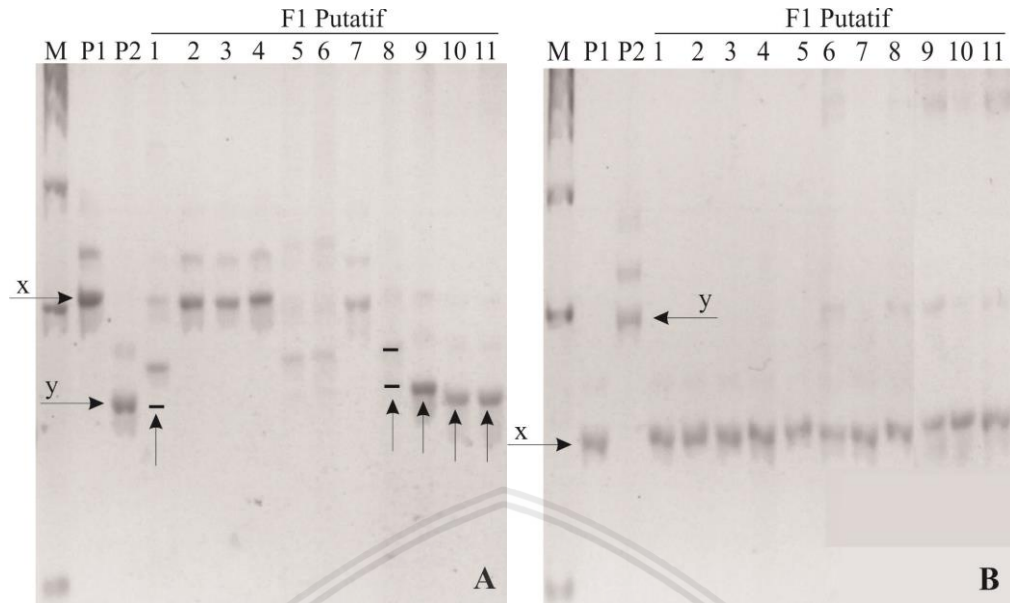
Elektroforegram F1 putatif hasil persilangan pada populasi Grobogan x Introduksi 10 ditunjukkan pada Gambar 7. Populasi Grobogan x Introduksi 10 menghasilkan tiga individu yang terverifikasi positif hasil persilangan dari total 11 individu tanaman yang diuji. Dua primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA tanaman F1 putatif ini berhasil memverifikasi individu positif hasil persilangan pada sampel F1 Grobogan x Introduksi 10-1, F1 Grobogan x 10-7, dan F1 Grobogan x 10-10. Hanya ketiga sampel tersebut yang memiliki pola pita heterozigot gabungan dari pola pita DNA tetua betina (Grobogan) dan tetua jantan (Introduksi 10). Sedangkan sampel lain hanya menunjukkan pola pita DNA homozigot seperti pola pita DNA tetua Grobogan.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp, P1 = Grobogan; P2 = Introduksi 12. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua jantan ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 8. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi 12 yang diamplifikasi. A) marka satt009 B) marka satt197

Elektroforegram F1 putatif hasil persilangan pada populasi Grobogan x Introduksi 12 ditunjukkan pada Gambar 8. Populasi Grobogan x Introduksi 12 menghasilkan 5 individu yang terverifikasi positif sebagai tanaman F1. Hanya satu marka SSR yang dapat memverifikasi individu F1 hasil persilangan pada populasi Grobogan x Introduksi 12, yaitu marka satt197. Marka satt009 yang digunakan untuk mengamplifikasi populasi Grobogan x Introduksi 12 menghasilkan pola pita monomorfik. Sedangkan marka satt197 menghasilkan pita polimorfik pada sampel tanaman F1 putatif Grobogan x 12-1, Grobogan x 12-2, Grobogan x 12-4, Grobogan x 12-10, dan Grobogan x 12-11. Kelima individu ini memiliki pola pita DNA yang heterozigot, artinya kelima individu-individu ini merupakan hasil dari persilangan yang berhasil, karena memiliki gabungan pola pita dari kedua tetua.



Keterangan: M = DNA Ladder 100 bp, P1 = Grobogan; P2 = Introduksi 13. Angka-angka yang tertera menunjukkan jumlah sampel pada populasi yang diuji. Pita DNA tetua betina ditunjukkan dengan panah x, sedangkan pita tetua jantan ditunjukkan dengan panah y. Keseluruhan individu F1 putatif menunjukkan kemiripan pola pita DNA dengan tetua betina. Sehingga, dalam verifikasi perlu mencocokkan pita pada tetua jantan dan betina dengan pita yang dihasilkan pada tanaman F1 putatif.

Gambar 9. Pola pita DNA F1 putatif hasil persilangan kedelai Grobogan x Introduksi 13 yang diamplifikasi. A) marka satt009 B) marka satt197

Elektroforegram F1 putatif hasil persilangan pada populasi Grobogan x Introduksi 13 ditunjukkan pada Gambar 9. Populasi ini memiliki 5 individu yang terverifikasi positif sebagai tanaman F1. Individu yang terverifikasi positif diantaranya F1 putatif Grobogan x Introduksi 13-1, Grobogan x Introduksi 13-8, Grobogan x Introduksi 13-9, Grobogan x Introduksi 13-10, dan Grobogan x Introduksi 13-11. Kelima individu ini memiliki pola pita gabungan dari pola pita kedua tetua, sehingga dapat dipastikan bahwa kelima individu ini merupakan individu yang berasal dari persilangan. Dari kedua marka, hanya marka satt009 yang mampu memverifikasi individu hasil persilangan, sedangkan marka satt197 hanya menghasilkan pita yang monomorfik. Hasil verifikasi tanaman F1 putatif disajikan pada Tabel 15.

Tabel 15. Tabulasi Hasil Verifikasi Tanaman F1 Putatif

Populasi Persilangan	F1 Putatif	Heterozigot	Homozigot	True F1
Biosoy 1 x Introduksi 10	12	2	10	2
Biosoy 1 x Introduksi 12	10	-	10	-
Biosoy 1 x Introduksi 13	10	-	10	-
Grobogan x Introduksi 10	11	3	8	3
Grobogan x Introduksi 12	11	5	6	5
Grobogan x Introduksi 13	11	5	7	5
Total	65			14

Data tabulasi menunjukkan bahwa terdapat 15 tanaman F1 putatif yang memiliki pita DNA heterozigot. Sampel yang memiliki pita DNA heterozigot, akan memiliki pola pita DNA yang berasal dari gabungan pola pita DNA kedua tetua. Oleh karena itu, tanaman yang memiliki pola pita DNA heterozigot akan dikonfirmasi sebagai tanaman *true F1*. Sehingga, dari data tabulasi terdapat 15 sampel tanaman F1 putatif yang terverifikasi sebagai tanaman F1 dari total 65 tanaman F1 putatif yang diverifikasi (tingkat keberhasilan persilangan 23.08%). Rendahnya presentase keberhasilan persilangan ini kemungkinan disebabkan oleh waktu persilangan yang terlambat, sehingga bunga betina sudah melakukan penyerbukan sendiri.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Persilangan Tanaman Kedelai

Persilangan ialah langkah awal dalam membentuk populasi yang bersegregasi. Kegiatan persilangan melibatkan ilmu dan kemahiran penyilang. Faktor yang memengaruhi keberhasilan persilangan antara lain musim, kesehatan tanaman, kondisi cuaca, dan variasi tanaman yang digunakan (Talukdar and Shivakumar, 2012). Pada persilangan yang telah dilakukan, populasi Grobogan x Introduksi 12 memiliki presentase keberhasilan persilangan tertinggi (45.95%), sedangkan populasi Biosoy 1 x Introduksi 13 memiliki presentase keberhasilan persilangan terendah (10.59%). Persentase keberhasilan persilangan dari seluruh

populasi termasuk dalam kategori rendah. Hal ini disebabkan karena keberhasilan persilangan kurang dari 50% (Lewers *et al.*, 1996). Rendahnya persentase keberhasilan persilangan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti kemahiran penyilang dalam melakukan persilangan, kompatibilitas tetua, dan keadaan lingkungan (Lubis *et al.*, 2015). Keberhasilan persilangan ditandai dengan layunya bunga yang telah disilangkan, dan diikuti dengan terbentuknya polong. Jumlah polong yang terbentuk dipengaruhi oleh kualitas serbuk sari yang menyerbuki kepala putik (Arifianto *et al.*, 2015). Keseluruhan populasi Biosoy 1, baik Biosoy 1 x Introduksi 10, Biosoy 1 x Introduksi 12, dan Biosoy 1 x Introduksi 13 memiliki presentase keberhasilan persilangan lebih rendah daripada populasi Grobogan x Introduksi 10, Grobogan x Introduksi 12, dan Grobogan x Introduksi 13. Hal ini diduga dipengaruhi oleh ukuran bunga Biosoy 1 yang lebih kecil daripada bunga Grobogan (Gambar 5). Ukuran bunga yang lebih kecil ini membuat tingkat kesulitan dalam menyilangkan populasi Biosoy 1 lebih tinggi dibandingkan dengan menyilangkan populasi Grobogan.

Populasi Biosoy 1 x Introduksi 13 memiliki rerata jumlah biji per polong yang terbentuk paling banyak diantara populasi lainnya (2.11). Diduga banyaknya biji yang terbentuk pada populasi ini karena serbuk sari yang digunakan saat melakukan persilangan tidak dibagi dengan bunga lain. Artinya, satu bunga jantan hanya disilangkan dengan satu bunga betina. Sehingga, jumlah serbuk sari yang disilangkan pada persilangan populasi Biosoy 1 x Introduksi 13 lebih banyak daripada kombinasi persilangan lainnya. Jumlah biji yang terbentuk dipengaruhi oleh kesuburan tanaman, fertilisasi dan jumlah serbuk sari yang diberikan, serangan hama, serta lingkungan (Arifianto *et al.*, 2015).

4.2.2 Uji Kualitatif dan Uji Kuantitatif DNA

Uji kualitatif dan kuantitatif DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian dan keutuhan DNA. Kemurnian DNA dihitung dengan menggunakan perbandingan absorbansi larutan DNA pada A_{260} dan A_{280} . DNA akan menyerap gelombang pada A_{260} , sedangkan protein akan menyerap gelombang pada A_{280} . DNA yang murni ditandai dengan nilai rasio A_{260}/A_{280} sebesar 1,8. Namun, secara umum kemurnian DNA berkisar pada nilai 1,7-2,0 (Chen *et al.*, 2010). Dari hasil uji kuantitatif seluruh DNA, didapatkan nilai kemurnian yang beragam, dengan rata-

rata sebesar 2,1. Hasil uji tersebut menandakan bahwa keseluruhan DNA yang diuji kurang murni. Nilai kemurnian DNA yang tinggi ini kemungkinan disebabkan adanya kontaminan berupa etanol atau metabolit sekunder pada organ tanaman (Putri, 2017). Meskipun hasil seluruh DNA tidak murni, namun keseluruhan DNA masih dapat digunakan dalam kegiatan analisis PCR berbasis marka, seperti marka SSR. Setiap DNA masih dapat digunakan dalam analisis PCR, karena penggunaan marka SSR tidak memerlukan DNA dalam jumlah dan kemurnian yang tinggi (Idrees and Irshad, 2014; Harahap, 2017).

Keutuhan DNA diamati menggunakan metode elektroforesis agarose 1%. Pita DNA dengan kualitas yang baik akan terlihat dengan tebal dan jelas (tidak *smear*). Hasil elektroforegram menunjukkan bahwa keseluruhan sampel menghasilkan pita DNA yang utuh dan tebal. Hal ini menunjukkan bahwa keseluruhan sampel sudah memenuhi persyaratan untuk dilanjutkan pada tahapan berikutnya, yaitu PCR-SSR.

4.2.3 Survei Polimorfisme Marka SSR pada Tetua

Survei polimorfisme marka dilakukan dengan elektroforesis sampel DNA yang telah diamplifikasi menggunakan gel poliakrilamid 8%. DNA target kedelai yang diamplifikasi menggunakan marka SSR dalam penelitian ini memiliki ukuran pasang basa berkisar antara 108-246 bp (Grant *et al.*, 2010). Pemilihan media gel elektroforesis harus disesuaikan agar mampu menghasilkan separasi pita yang jelas. Gel agarose baik digunakan untuk separasi fragmen DNA dengan berat molekul yang tinggi. Sedangkan gel poliakrilamid mampu menghasilkan separasi yang jelas dan baik terutama pada fragmen DNA dengan berat molekul rendah. Sehingga, separasi pita DNA kedelai akan lebih baik jika menggunakan gel poliakrilamid. Penggunaan gel poliakrilamid 8% juga sudah tepat dalam mengamplifikasi DNA dengan ukuran antara 40-500 bp (Barril and Nates, 2012).

Visualisasi elektroforegram digunakan untuk menentukan polimorfisme primer-primer yang digunakan. Primer dengan polimorfisme tinggi akan menghasilkan pola pita-pita hasil amplifikasi (*amplicon*) dengan ukuran beragam. Pola pita *amplicon* yang berbeda menandakan bahwa DNA genom antar materi genetik yang digunakan berbeda sehingga, pola pita *true FI* akan mengikuti pola pita DNA kedua tetua. Pola pita gabungan tersebut digunakan untuk verifikasi

kebenaran individu generasi F1 dari alel yang diturunkan dari kedua tetua persilangannya (Lestari *et al.*, 2017).

4.2.4 Verifikasi Tanaman F1 Putatif Hasil Persilangan

Hasil survei primer polimorfik digunakan untuk menentukan primer-primer mana saja yang digunakan untuk mengonfirmasi tanaman F1 hasil persilangan. Setiap populasi diidentifikasi dengan 2 pasang primer. Verifikasi tanaman hasil persilangan dilakukan dengan membandingkan pola pita DNA tanaman F1 putatif dengan pola pita DNA kedua tetua yang telah diamplifikasi, pada gel poliakrilamid 8%. Tanaman F1 putatif yang terverifikasi positif hasil persilangan akan memiliki pola pita heterozigot hasil penggabungan pita DNA kedua tetua (Tasma *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2019). Sebagai contoh, pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 10 (gambar 3), pita B menunjukkan pola pita tetua betina, sedangkan pita 10 menunjukkan pola pita tetua jantan. Pola pita F1-7 dan F1-12 menunjukkan bahwa kedua individu tersebut merupakan individu F1 positif hasil persilangan, karena memiliki pola pita DNA dari kedua tetua (pola pita heterozigot). Menurut data hasil tabulasi, dari 65 tanaman F1 putatif yang diuji hanya 14 tanaman saja (21.5%) yang terverifikasi positif sebagai tanaman F1 hasil persilangan (tabel 15).

Tanaman F1 positif hasil persilangan terbanyak ada pada populasi Grobogan x Introduksi 12, dan Grobogan x Introduksi 13 (5 tanaman). Populasi Grobogan x Introduksi 10 menghasilkan 3 tanaman F1 positif, populasi Biosoy 1 x Introduksi 10 hanya menghasilkan 2 tanaman F1 positif, sedangkan populasi Biosoy 1 x Introduksi 12, dan Biosoy 1 x Introduksi 13 tidak menghasilkan tanaman F1 positif. Jumlah individu F1 positif ini dipengaruhi oleh keberhasilan persilangan pada masing-masing populasi. Populasi Biosoy 1 memiliki tingkat keberhasilan persilangan lebih rendah dibandingkan dengan populasi Grobogan. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan masa reseptif dan antesis pada kedua tetua. Biosoy 1 memiliki umur berbunga 33 hari, sedangkan tiap tetua Introduksi memiliki umur berbunga 30 hari. Perbedaan umur berbunga ini yang memengaruhi tingkat kemasakan serbuk sari dan putik. Penelitian serupa menunjukkan bahwa persilangan antara kedelai varietas Tanggamus dan Burangrang menghasilkan jumlah persilangan terendah, yang disebabkan oleh perbedaan umur berbunga antara kedua varietas tersebut (Alia dan Wilia, 2011).

Berdasarkan hasil elektroforegram, dapat diidentifikasi bahwa tidak semua tanaman F1 putatif yang diuji merupakan hasil persilangan dari kedua tetua. Hal tersebut ditunjukkan dengan pola pita homozigot saat dilakukan verifikasi dengan menggunakan primer-primer terpilih, sehingga dapat dikatakan bahwa F1 putatif yang tidak menunjukkan gabungan dari kedua pola pita kedua tetua tidak dikonfirmasi sebagai *true F1*. Individu-individu yang bukan *true F1*, merupakan hasil penyerbukan sendiri. Setiap tanaman F1 yang diuji merupakan hasil panen polong yang ditandai sebagai hasil persilangan. Namun, setelah diuji menggunakan marka SSR, ternyata terdapat individu-individu yang bukan hasil persilangan. Diduga pada saat melakukan persilangan, bunga betina telah terserbuki oleh serbuk sari, atau dalam hal ini bunga betina telah melakukan penyerbukan sendiri (Matsuo *et al.*, 2015). Tanaman kedelai termasuk ke dalam tanaman *cleistogamy*, artinya tanaman dapat melakukan penyerbukan sendiri sebelum bunga mekar (saat bunga masih kuncup) (Benitez *et al.*, 2010). Sehingga, kemungkinan tanaman menyerbuk sendiri sebelum dilakukan persilangan.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa verifikasi hasil persilangan tanaman kedelai Grobogan dan Biosoy 1 dengan kedelai introduksi menggunakan 5 pasang primer SSR terpilih menunjukkan dari 65 tanaman F1 putatif yang diuji, hanya terdapat 15 tanaman yang terverifikasi merupakan *true F1* karena memiliki pita DNA yang berasal dari gabungan pita DNA kedua tetua. F1 positif terbanyak terdapat pada populasi Grobogan x Introduksi 12 dan Grobogan x Introduksi 13, yaitu sebanyak 5 tanaman. Sedangkan F1 positif paling sedikit terdapat pada populasi Biosoy 1 x Introduksi 10, yaitu sebanyak 2 tanaman F1. Individu F1 positif hasil persilangan memiliki gabungan pola pita DNA dari kedua tetua.

5.2. Saran

Perlu dilakukan pengamatan karakter morfologi agar menjadi data pendukung dan pembandingan dari data verifikasi hasil persilangan berdasarkan marka molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Adie, M.M., dan A. Krisnawati. 2007. Biologi tanaman kedelai. Kedelai – Teknik Produksi dan Pengembangan. p. 45–73
- Alia, Y., dan W. Wilia. 2011. Persilangan empat varietas kedelai dalam rangka penyediaan populasi awal untuk seleksi. J. Penelit. Univ. Jambi Seri Sains 13(1): 39–42.
- Arifianto, H., D.S. Hanafiah, dan E.H. Kardhinata. 2015. Uji F1 dari persilangan genotip antara beberapa varietas kedelai (*Glycine max* L. Merrill) terhadap tetua masing-masing. Online Agroekoteknologi 3(3): 1169–1179.
- Banaszkiewicz, T. 2011. Nutritional value of soybean meal. In: El Shemy, H.A., editor, Soybean and Nutrition. 1st ed. InTech, Croatia. p. 411–432
- Barril, P., and S. Nates. 2012. Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities. In: Sameh, M., editor, Gel Electrophoresis - Principles and Basics. InTech. p. 3–14
- Bekele, A., and E. Bekele. 2014. Overview: morphological and molecular markers role in crop improvement programs. Int. J. Curr. Res. Life Sci. 3(3): 35–42.
- Benitez, E.R., N.A. Khan, H. Matsumura, J. Abe, and R. Takahashi. 2010. Varietal differences and morphology of cleistogamy in soybean. Crop Sci. 50(1): 185–190. doi: 10.2135/cropsci2009.02.0108.
- Chaerani, N. Hidayatun, dan D.W. Utami. 2011. Keragaman genetik 50 aksesori plasma nutfah kedelai berdasarkan sepuluh penanda mikrosatelit. J. AgroBiogen 7(2): 96. doi: 10.21082/jbio.v7n2.2011.p96-105.
- Chen, H., M. Rangasamy, S.Y. Tan, H. Wang, and B.D. Siegfried. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS One 5(8). doi: 10.1371/journal.pone.0011963.
- Desjardins, P.R., and D.S. Conklin. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. J. Vis. Exp. 45: 1–4. doi: 10.1002/0471142727.mba03js93.
- Doyle, J.J., and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (Madison). 12(1): 13–15.
- Garrido-Cardenas, J.A., C. Mesa-Valle, and F. Manzano-Agugliaro. 2017. Trends in plant research using molecular markers. Planta 247(3): 543–557. doi: 10.1007/s00425-017-2829-y.
- Grant, D., R.T. Nelson, S.B. Cannon, and R.C. Shoemaker. 2010. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. Nucleic Acids Res. 38(SUPPL.1). doi: 10.1093/nar/gkp798.
- Hakim, M.L., O. Wiratno, dan M.A. Abdurachman. 2017. Statistik lahan pertanian tahun 2012-2016. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian, Jakarta.

- Harahap, A.S. 2017. Uji kualitas dan kuantitas DNA beberapa populasi pohon kapur Sumatera. *J. Anim. Sci. Agron. Panca Budi* 2(2): 1–6.
- Henry, R.J. 2013. Evolution of DNA marker technology in plants. In: Henry, R.J., editor, *Molecular Markers in Plants*. John Wiley & Sons, Inc., Iowa, USA. p. 4–8
- Idrees, M., and M. Irshad. 2014. Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *Eur. Acad. Res.* 2(1): 1513–1540. doi: 10.1016/j.bbapap.2007.11.002.
- Jonah, P.M., L.L. Bello, O. Lucky, A. Midau, and S.M. Moruppa. 2011. Review : The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Glob. J. Sci. Front. Res.* 11(5): 5–12. https://globaljournals.org/GJSFR_Volume11/2-Review-The-Importance-of-Molecular.pdf.
- Kartono. 2005. Persilangan buatan pada empat varietas kedelai. *Bul. Tek. Pertan.* 10(2): 49–52.
- Khan, F., K.R. Hakeem, T.O. Siddiqi, and A. Ahmad. 2013. RAPD markers associated with salt tolerance in soybean genotypes under salt stress. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170(2): 257–272. doi: 10.1007/s12010-013-0182-6.
- Kordrostami, M., and M. Rahimi. 2015. Molecular markers in plants: concepts and applications. *Genet. 3rd Millenium* 13(2): 4022–4029. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Lateef, D.D. 2015. DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. *J. Biosci. Med.* 03(05): 7–18. doi: 10.4236/jbm.2015.35002.
- Lestari, P., Sustiprijatno, dan Asadi. 2017. Konfirmasi Penurunan Alel Tetua Persilangan Kedelai Pada Generasi F1 Berdasarkan Marka SSR. *Biologi, Pembelajaran, dan Lingkungan Hidup Perspektif Interdisipliner*. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang. p. 1–6
- Lewers, K.S., S.K. St. Martin, B.R. Hedges, M.P. Widrlechner, and R.G. Palmer. 1996. Hybrid soybean seed production: comparison of three methods. *Crop Sci.* 36(6): 1560–1567. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600060026x.
- Li, F., X. Liu, S. Wu, Q. Luo, and B. Yu. 2019. Hybrid identification for Glycine max and Glycine soja with SSR markers and analysis of salt tolerance. *PeerJ* 7: e6483. doi: 10.7717/peerj.6483.
- Lubis, N.A., Rosmayanti, dan D.S. Hanafiah. 2015. Persilangan Genotipe-Genotipe Kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) Hasil Seleksi pada Tanah Salin dengan Tetua Betina Varietas Grobogan. *J. Online Agroekoteknologi* 3(2337–6597): 291–298.
- Matsuo, É., T. Sedyama, C.D. Cruz, S.H. Brommonschenkel, S. da C. Ferreira, et al. 2015. Efficiency of artificial hybridization in soybean during the summer depending on temperature and relative humidity. *Biosci. J.* 31(6): 1663–1670. doi: 10.14393/bj-v31n6a2015-26171.
- Nadeem, M.A., M.A. Nawaz, M.Q. Shahid, Y. Doğan, G. Comertpay, et al. 2017.

- DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2818: 1–25. doi: 10.1080/13102818.2017.1400401.
- Nuryati, L., B. Waryanto, dan R. Widaningsih. 2016. Outlook komoditas pertanian sub sektor tanaman pangan kedelai. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian, Jakarta.
- O’Keefe, S., L. Bianchi, and J. Sharman. 2015. Soybean nutrition. *SM J. Nutr. Metab.* 1(2): 1006.
- Putri, R.E. 2017. Keragaman genetik varietas kedelai introduksi USDA berdasarkan marka SSR (Simple Sequence Repeat) dan morfologi. <http://repository.umy.ac.id/handle/123456789/15365>.
- Qi, X., M.W. Li, M. Xie, X. Liu, M. Ni, et al. 2014. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing. *Nat. Commun.* 5: 1–11. doi: 10.1038/ncomms5340.
- Sammour, R.H. 2014. Morphological, cytological and biochemical characterization of soybean germplasm. *Biosci. Rev.* 8(7): 277–284.
- Talukdar, A., and M. Shivakumar. 2012. Pollination without emasculation: An efficient method of hybridization in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Curr. Sci.* 103(6): 628–630.
- Tasma, I.M. 2013. Gen dan QTL pengendali umur pada kedelai. *J. AgroBiogen* 9(2): 85–96.
- Tasma, I.M., D. Satyawan, A. Warsun, M. Yunus, and B. Santosa. 2011. Phylogenetic and maturity analyses of sixty soybean genotypes used for DNA marker development of early maturity quantitative trait loci in soybean. *J. AgroBiogen* 7(1): 37–46.
- Tasma, I.M., and A. Warsun. 2009. Genetic diversity analysis of aluminum-toxicity tolerant and sensitive soybean genotypes assessed with microsatellite markers. *J. AgroBiogen* 5(1): 1–6.
- Tasma, I.M., A. Warsun, and Asadi. 2008. Development and characterization of F2 population for molecular mapping of aluminum-toxicity tolerant QTL in soybean. *J. AgroBiogen* 4(1): 1–8.
- Terryana, R.T., K. Nugroho, K. Mulya, N. Dewi, dan P. Lestari. 2017. Keragaman genotipik dan fenotipik 48 aksesori kedelai introduksi asal Cina. *J. AgroBiogen* 13(1): 1–16.
- Yuliasti, and Reflinur. 2017. Field performance of five soybean mutants under drought stress conditions and molecular analysis using SSR markers. *Atom Indones.* 43(2): 103–109. doi: 10.17146/aj.2017.685.
- Zargar, M., E. Romanova, A. Trifonova, E. Shmelkova, and P. Kezimana. 2017. AFLP-analysis of genetic diversity in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars Russian and foreign selection. *Agron. Res.* 15(5): 2217–2225. doi: 10.15159/AR.17.066.

