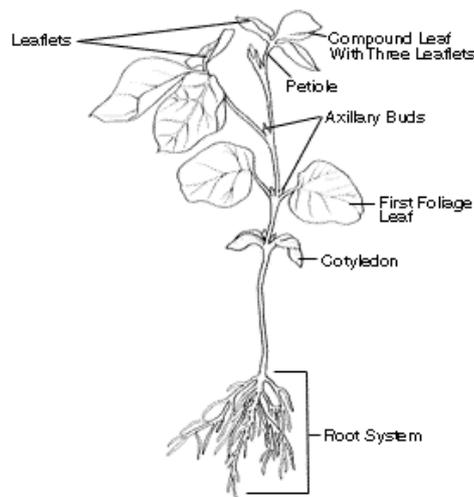


I. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kedelai (*Glycine max*)

Kedelai merupakan tanaman yang berasal dari Manchuria atau daratan Cina bagian timur laut dan pada pertengahan abad 20 telah menyebar ke seluruh dunia. Berbagai negara tujuannya, yaitu Jepang, Korea, India, Australia, Amerika dan Indonesia. Kedelai mulai dikenal di Indonesia sejak abad ke-16. Awal mula penyebaran dan pembudidayaan kedelai yaitu di Pulau Jawa, kemudian berkembang ke Bali, Nusa Tenggara, dan pulau-pulau lainnya. Pada awalnya, kedelai dikenal dengan beberapa nama botani, yaitu *Glycine soja* dan *Soja max*. Namun pada tahun 1948 telah disepakati bahwa nama botani yang dapat diterima dalam istilah ilmiah, yaitu *Glycine max* (L.) Merrill (Dasuki, 1991 dalam Marianah, 2012)

Kedelai memiliki klasifikasi divisi Spermatophyta, kelas Dicotyledoneae, ordo Rosales, famili Papilionaceae, genus *Glycine* dan spesies *Glycine max* (L.) Merrill (Dasuki, 1991 dalam Marianah, 2012).



Gambar 1. Habitus Tanaman Kedelai (*Glycine max*) (Anonim, 2019).

Komponen lingkungan yang menjadi penentu keberhasilan usaha produksi kedelai adalah faktor iklim, kesuburan fisika, kimia dan biologi tanah. Faktor iklim antara lain suhu, sinar matahari, curah dan distribusi hujan. Sedangkan faktor kesuburan fisika, kimia dan biologi tanah meliputi solum, tekstur tanah, pH tanah, ketersediaan hara, kelembapan tanah, bahan organik dalam tanah, drainase dan aerasi tanah, serta mikrobial tanah (Sumarno, 2016).

Tanaman kedelai adalah tanaman yang dapat tumbuh baik pada dataran rendah dengan ketinggian 1-1000 mdpl. Kedelai termasuk tanaman yang memerlukan penyinaran penuh dengan panjang hari berkisar 11-16 jam dan panjang hari optimal untuk memperoleh produksi tinggi adalah panjang hari 14-15 jam. Suhu optimal untuk pertumbuhan kedelai adalah 22-27°C dengan kelembapan tanah 60-80% kapasitas lapang. Kondisi yang baik untuk pertumbuhan kedelai adalah curah hujan 100-150 mm perbulan pada dua bulan sejak tanam. Tekstur tanah yang sesuai dengan pertumbuhan kedelai adalah yang kaya dengan bahan organik, tekstur tanah berliat dan berdrainase baik, atau tanah lempung berpasir dengan mendekati netral, pada pH 5,5-7,0 dan pH optimal 6,0-6,5. Pada kisaran pH tersebut hara makro dan mikro tersedia bagi tanaman kedelai (Sumarno, 2016).

Selama periode 2002–2015 konsumsi kedelai cukup fluktuatif dan cenderung menurun, dengan laju penurunan rata-rata 2,15% per tahun. Namun permintaan akan kebutuhan pangan bahan dasar kedelai tidak pernah surut. Melihat produktivitas kedelai nasional tahun 1980 sampai dengan tahun 2015 menunjukkan pola fluktuatif dan cenderung meningkat rata-rata 1,70% per tahun.

Peningkatan produktivitas nasional disumbang oleh pertumbuhan di Jawa sebesar 1,91% per tahun dan luar Jawa sebesar 1,58% per tahun. Dilihat dari produksi kedelai nasional pada periode 1980-2015 berfluktuasi dan cenderung meningkat dengan rata-rata pertumbuhan sebesar 2,37% per tahun. Pada periode ini, tren produksi kedelai di Jawa dan luar Jawa juga seirama, namun luar Jawa lebih tinggi dari pada Jawa. Peningkatan produksi di Jawa rata-rata sebesar 1,43% per tahun dan luar Jawa sebesar 5,47% per tahun (Setyeno, 2010).

Perbandingan permintaan pasar, produktivitas serta produksi kedelai yang belum menyeluruh mengakibatkan pemenuhan pasokan juga masih kurang, sehingga pemenuhan pasokan dilakukan dengan cara impor. Kedelai sebagian besar diimpor dari Monsanto, Amerika yang telah disisipi gen transgenik salah satunya adalah gen EPSP-CP4 (Wardani dkk., 2017).

Kedelai impor dan lokal mempunyai perbedaan karakteristik. Ozal (2012) menyebutkan kedelai lokal unggul dari impor dalam hal bahan baku pembuatan tahu. Rasa tahu lebih lezat, rendemennya pun lebih tinggi, dan resiko terhadap kesehatan cukup rendah karena bukan benih transgenik. Sementara kedelai impor sebaliknya. Sekalipun unggul sebagai bahan baku tahu, kedelai lokal punya kelemahan untuk bahan baku tempe. Penyebabnya, ukuran kecil atau tidak seragam dan kurang bersih, kulit ari kacang sulit terkelupas saat proses pencucian kedelai, proses peragiannya pun lebih lama. Lalu setelah berbentuk tempe, proses pengukusan lebih lama empuknya. Bahkan bisa kurang empuk. Dalam hal budidaya kedelai baik lokal maupun impor punya kelebihan masing-masing. Kedelai lokal memiliki umur tanaman lebih singkat 2,5-3 bulan daripada impor

yang mencapai 5 - 6 bulan. Benihnya pun lebih alami dan non-transgenik. Akan tetapi dalam hal produktivitas dan luas lahan, kedelai impor lebih tinggi. Bila varietes lokal umumnya masih memproduksi di bawah 2 ton per hektare, maka impor bisa mencapai 3 ton per hektarenya. Biji impor pun umumnya lebih besar. Lemahnya produktivitas kedelai lokal tersebut tidak didukung oleh industri perbenihan yang kuat, mekanisasi usaha tani berskala besar serta efisien, dan juga lahan khusus kedelai yang luas.

B. Gen EPSPS-CP4

Gen EPSPS (*3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase*) merupakan gen dari mutan *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 yang disisipkan kedalam tanaman agar tahan terhadap herbisida glifosat. Tanaman tahan herbisida glifosat resisten ketika disemprot herbisida glifosat karena transgene EPSPS dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang telah disisipkan tidak dapat diikat oleh glifosat sehingga gen tersebut tetap memproduksi asam amino aromatik dan tanaman tetap tumbuh dengan baik (Duke dan Powles, 2008).

Tanaman yang tidak disisipi oleh gen EPSPS-CP4 tidak akan mampu bertahan hidup jika terkena herbisida. Hal ini karena herbisida menghentikan kerja EPSPS, enzim yang berperan penting dalam mensintesis asam amino aromatik *tyrosine*, *phenilalanin* dan *tryptohan* yang dapat memblok protein untuk biosintesis asam amino aromatik pada tanaman. Tanpa enzim EPSPS tanaman tidak dapat memproduksi protein yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan menyebabkan tanaman menguning dan mati dalam beberapa hari atau minggu setelah penyemprotan herbisida ini (Damayanti, 2014).

Gen EPSPS-CP4 ini ditemukan di tanaman jagung dengan gen simbol LOC542727 dan merupakan gen pengkode protein. Gen ini terletak pada kromosom 9 dengan jumlah ekson 8. Gen EPSPS-CP4 bekerja dengan mengkatalisasi transfer kelompok karboksinvinil dari *phosphoenolpyruvate* (PEP) ke *shikimate-3-fosfat* dan pada tanaman adalah target herbisida glifosat. EPSPSs dengan efisiensi katalitik tinggi dan ketidakepekaan terhadap glifosat berasal dari mikroba, termasuk enzim dari *Agrobacterium* strain CP4, di mana ketidakepekaan diberikan oleh alanin situs aktif. Dalam konteks urutan EPSPS tanaman, alanin menggantikan glisin pada posisi yang sama mengganggu pengikatan glifosat dan PEP (NCBI, 2019).

Pendeteksian gen dilakukan dengan menggunakan primer. Primer khusus yang digunakan untuk deteksi gen EPSPS CP4 untuk diamplifikasi, terutama dalam proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yaitu menggunakan primer RRS0t. Pasangan primer *forward* dan *reverse* yang digunakan adalah primer RRS0t dengan suhu *annealing* 55°C, 56°C, 58°C, 59°C dan 60°C. Pasangan primer RRS0t-5 (*forward*) dan RRS0t-3 (*reverse*) memiliki area amplifikasi sebesar 121 bp (Tung, dkk., 2008).

Tabel 1. Daftar nama dan susunan primer untuk deteksi sekuen EPSPS-CP4

No	Nama Primer	Susunan primer	Jumlah basa	Panjang DNA yang terdeteksi
1	RRS0t-5 (f)	5'CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TG-3'	23 basa	121 bp
2	RRS01-3 (r)	5'GAC TTG TCG CCG GGA ATG-3'	18 basa	

(Tung, dkk., 2008).

Menurut Bahagiawati (2014) beberapa komoditas tanaman hasil rekayasa tanaman yang tahan terhadap herbisida glifosat dan telah diperbanyak di dunia

diantaranya yaitu jagung, kanola, tomat, kentang, kapas dan kedelai. Kedelai merupakan komoditas palawija yang kebutuhannya dipasaran terus mengalami kenaikan untuk kebutuhan konsumsi.

Di pasar Indonesia pelabelan produk transgenik belum dilakukan pada kemasan produk, termasuk pada kedelai yang beredar di pasaran. Hetami (2009) menyebutkan bahwa pelabelan memungkinkan konsumen untuk memilih produk-produk sesuai dengan pilihan etik, agama, kepercayaan (*dietary*) dan budaya mereka. Tuntutan konsumen atas informasi menunjukkan adanya keingintahuan terhadap risiko dan keuntungan produk rekayasa genetika. Dengan pelabelan produk pemerintah dapat dengan cepat melakukan identifikasi dan menarik suatu produk dari pasaran, atau untuk melakukan tindakan pemulihan (*remedial measures*). Dengan demikian pelabelan merupakan komponen yang esensial dari pendekatan pencegahan yang lebih luas atas komersialisasi produk rekayasa genetika sekaligus sebagai suatu langkah cermat dalam mengantisipasi perdagangan bebas

Pelabelan mengacu pada Peraturan Pemerintah Nomor 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan pada Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI Nomor HK.03.1.23.03.12.1564 Tahun 2012 tentang Pengawasan Pelabelan Pangan Produk Rekayasa Genetik. Pelabelan pangan PRG dapat mempermudah publik dalam memperoleh informasi suatu produk, sehingga konsumen teredukasi untuk semakin selektif memilih suatu produk yang aman dan berkualitas (Hetami, 2009). Dengan adanya simpang siur informasi produk

rekayasa genetika karena belum adanya pelabelan, maka perlu adanya deteksi tanaman kedelai transgenik yang dapat dilakukan dengan cara analisis *genotyping*.

Dalam penentuan perbedaan susunan genetik (genotipe) dari individu dengan memeriksa urutan DNA individu menggunakan tes biologis dan membandingkannya dengan urutan referensi individu lain diperlukan suatu proses yang disebut dengan *genotyping*. Hal ini bertujuan untuk mengungkapkan alel yang telah diwariskan individu dari induknya. Secara ringkas *genotyping* merupakan penggunaan rangkaian DNA untuk menentukan populasi biologis dengan menggunakan alat-alat molekuler (Andisa, 2014).

Teknik *genotyping* digunakan untuk melihat perbedaan individu pada tingkat DNA. Beberapa teknik *genotyping* antara lain DNA *fingerprinting*, PCR dengan penanda *microsatellite* atau *SSR*, *RFLP*, *SNP* dan sekuensing. *Genotyping* penting dalam penelitian gen dan varian gen yang terkait dengan penyakit (Hadiarto, 2015).

Material genetik dari semua organisme multiseluler terkandung dalam rantai double-helix asam deoksiribonukleat (DNA). DNA tersusun atas 4 basa nitrogen purin dan pirimidin dengan berbagai susunan dan panjang. Hal ini sangat penting untuk keperluan identifikasi rekayasa genetika (Andisa, 2014). Salah satu teknik dalam *genotyping* ini adalah dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Sebelum dilakukan PCR (*Polymerase Chain Reaction*), langkah awal yang dilakukan adalah dengan isolasi DNA.

C. Isolasi DNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diturunkan kepada keturunannya. DNA memiliki struktur pilinan utas ganda yang antiparalel dengan komponen-komponennya, yaitu gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, dan pasangan basa. Pasangan basa pada DNA terdiri atas dua macam, yaitu basa purin dan pirimidin. Basa purin terdiri atas adenin (A) dan guanin (G) yang memiliki struktur cincinganda, sedangkan basa pirimidin terdiri atas sitosin (C) dan timin (T) yang memiliki struktur cincin-tunggal. Ketika guanin berikatan dengan sitosin, maka akan terbentuk tiga ikatan hidrogen, sedangkan ketika adenin berikatan dengan timin maka hanya akan terbentuk dua ikatan hidrogen. Satu komponen pembangun (*building block*) DNA terdiri atas satu gula pentosa, satu gugus fosfat dan satu pasang basa yang disebut nukleotida (Faatih, 2009).

Basa pada molekul DNA membawa informasi genetik, sedangkan gula dan gugus fosfat mempunyai peranan struktural. Gula dalam deoksiribonukleotida merupakan deoksiribosa. Awalan deoksi menunjukkan bahwa gula ini kekurangan satu atom oksigen yang ada pada ribosa, senyawa induknya. Sebuah nukleosida terdiri dari basa dan purin atau pirimidin yang berikatan dengan gula. Keempat unit nukletida dalam DNA disebut deoksiadenosin, deoksiganosin, deoksitimidin, dan deoksitidin (Rosana, 2018).

DNA pada makhluk hidup dapat ditemukan pada inti sel (nukleus), mitokondria, dan klorofil. Pola pewarisan spesifik pada DNA inti dan DNA mitokondria menentukan teknis identifikasi DNA. Identifikasi DNA inti dapat

dilakukan dari semua sel tubuh yang memiliki inti. Sampel yang didapatkan dari TKP harus diperlakukan sebagai barang bukti. Identifikasi DNA adalah upaya untuk membandingkan antara profil DNA barang bukti dengan pembanding sehingga dapat disimpulkan apakah profil DNA barang bukti cocok (*match*) dengan pembanding atau tidak (Yosephi, 2016).

Isolasi DNA dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari bahan lain seperti protein, lemak, dan karbohidrat. Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (*lisis*), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses isolasi DNA antara lain harus menghasilkan DNA tanpa adanya kontaminan seperti protein dan RNA; metodenya harus efektif dan bisa dilakukan untuk semua spesies metode yang dilakukan tidak boleh mengubah struktur dan fungsi molekul DNA; dan metodenya harus sederhana dan cepat (Corkill dan Rapley, 2008).

Isolasi DNA tanaman, isolasi DNA buah, isolasi DNA bakteri, dan isolasi DNA hewan pada dasarnya memiliki prinsip yang sama. Prinsip isolasi DNA pada berbagai jenis sel atau jaringan pada berbagai organisme pada dasarnya sama namun memiliki modifikasi dalam hal teknik dan bahan yang digunakan. Bahkan beberapa teknik menjadi lebih mudah dengan menggunakan kit yang diproduksi oleh suatu perusahaan. Penggunaan teknik isolasi DNA dengan kit dan manual memiliki kelebihan dan kekurangan. Metode konvensional memiliki kelebihan harga lebih murah dan digunakan secara luas sementara kekurangannya

membutuhkan waktu yang relatif lama dan hasil yang diperoleh tergantung jenis sampel (Priyambodo, 2017).

Cara mengetahui kualitas dan kuantitas DNA dapat dilakukan dengan uji :

1. Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dapat dilakukan dengan analisis menggunakan gel agarose dalam elektroforesis. kuantitatif DNA. Nur dan Adijuwana (1987) menjelaskan bahwa elektroforesis merupakan satu teknik pemisahan senyawa berdasarkan kecepatan migrasi yang bermuatan listrik di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis digunakan untuk menentukan komposisi protein dari suatu produk makanan. Elektroforesis juga dapat digunakan untuk menentukan ketulenan suatu ekstrak protein. Kegunaan elektroforesis yang lainnya adalah untuk menentukan berat molekul, kemurnian molekul pada suatu bahan, mendeteksi suatu pemalsuan bahan, mendeteksi kerusakan suatu bahan seperti protein dalam pengolahan dan penyimpanan, untuk memisahkan spesies-spesies yang berbeda secara kualitatif, serta pemurnian suatu protein.

Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekuler. Prinsip dasar teknik ini adalah molekul DNA, RNA atau protein dapat dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan tersebut bergantung pada ukuran molekulnya. Sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel yang ditempatkan di dalam larutan penyangga yaitu TAE (Tris HCl-Acetic acid-EDTA), dan listrik dialirkan sebesar 80 Volt. Molekul-molekul sampel akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai muatannya. RNA dan DNA arah

pergerakannya adalah menuju elektroda positif, disebabkan oleh muatan negatif pada rangka gula-fosfat yang dimilikinya (Nur dan Adijuwana, 1987).

Gel yang digunakan adalah agarosa. Marka atau penanda (marker) yang digunakan pada proses running merupakan campuran molekul dengan ukuran berbeda-beda yang dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekul dalam pita sampel. Ukuran DNA dapat ditentukan dengan menyertakan marka atau penanda yang digunakan pada proses running. Setelah tahap running selesai, dilakukan metode pewarnaan (staining) dan penghilangan warna (destaining). Metode pewarnaan pada DNA merupakan pewarnaan gel agarosa yang dilakukan dengan menggunakan larutan *ethidium bromide* selama 15 menit. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar molekul sampel berpendar dalam sinar ultraviolet. Penghilangan warna dilakukan dengan cara gel dimasukkan ke dalam aquades selama 5 hingga 7 menit (Nur dan Adijuwana, 1987).

2. Kuantitas DNA

Uji kuantitatif DNA merupakan suatu analisis untuk menentukan kandungan atau jumlah DNA yang terdapat dalam suatu zat atau komponen zat yang sebelumnya telah diketahui keberadaan DNA plasmidnya dalam larutan dengan uji kualitatif. Uji kuantitatif DNA menggunakan alat spektrofotometri. DNA yang mengandung basa-basa purin dan pirimidin dapat menyerap cahaya UV. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini maka kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan absorbansi 280 nm.

Kemurnian dikatakan tinggi apabila rasio pada A260/280 memiliki nilai 1,80-2,00 dan A260/230 memiliki nilai 1,80-2,20 (Fatchiyah, 2010). Setelah dilakukannya isolasi DNA, tahap selanjutnya adalah dengan melakukan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

D. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Reaksi berantai polymerase, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR memungkinkan dilakukannya pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA *template* (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik (Yusuf, 2010).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA *template* (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20–40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Dalam mendapatkan hasil PCR yang optimal perlu dilakukan optimasi proses PCR. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor seperti:

1. Jenis polimerase DNA

Kemampuan mengkatalisis reaksi polimerasi DNA pada proses PCR yang terjadi pada tahap ekstensi untuk DNA rantai panjang akan berbeda dengan untuk DNA rantai pendek. Penggunaan jenis DNA polimerase tergantung pada panjang DNA target yang akan diamplifikasi. Panjang fragmen DNA lebih besar dari tiga kilobasa akan memerlukan jenis polimerase dengan aktivitas tinggi (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

2. Konsentrasi dNTPs, $MgCl_2$ dan polimerase DNA

Konsentrasi optimal dNTPs ditentukan oleh panjang target DNA yang diamplifikasi. Untuk panjang target DNA kurang dari satu kilobasa biasanya digunakan konsentrasi dNTPs sebanyak 100 μM , sedangkan untuk panjang target DNA lebih besar dari satu kilobasa diperlukan konsentrasi dNTPs sebanyak 200 μM . Umumnya konsentrasi optimal $MgCl_2$ berkisar antara 1,0–1,5 mM. Konsentrasi $MgCl_2$ yang terlalu rendah akan menurunkan perolehan PCR. Sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan akumulasi produk non target yang disebabkan oleh terjadinya *mispriming*. Jumlah polimerase DNA yang digunakan tergantung pada panjang fragmen DNA yang akan diamplifikasi. Biasanya untuk panjang fragmen DNA kurang dari dua kilobasa diperlukan 1,25–2 unit per 50 μL campuran reaksi (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

3. Suhu

Pemilihan suhu pada proses PCR sangat penting karena suhu merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan suatu PCR. Dalam hal ini suhu berkaitan dengan proses denaturasi DNA *template*, *annealing* dan ekstensi primer. Suhu denaturasi DNA templat berkisar antara 93 – 95°C, ini semua tergantung pada panjang DNA *template* yang digunakan dan juga pada panjang fragmen DNA target. Suhu denaturasi yang terlalu tinggi akan menurunkan aktivitas polimerase DNA yang akan berdampak pada efisiensi PCR. Selain itu juga dapat merusak DNA templat, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan proses denaturasi DNA templat tidak sempurna. Pada umumnya suhu denaturasi yang digunakan adalah 94°C. Secara umum suhu *annealing* yang digunakan berkisar antara 37-60°C. Pemilihan suhu *annealing* berkaitan dengan T_m primer yang digunakan untuk proses PCR. Suhu *annealing* yang digunakan dapat dihitung berdasarkan $(T_m - 5)^\circ\text{C}$ sampai dengan $(T_m + 5)^\circ\text{C}$. Dalam menentukan suhu *annealing* yang digunakan perlu diperhatikan adanya *mispriming* pada daerah target dan nontarget, dan keberhasilan suatu proses PCR akan ditentukan oleh eksperimen. Proses ekstensi primer pada proses PCR selalu dilakukan pada suhu 72°C karena suhu tersebut merupakan suhu optimum polimerase DNA yang biasa digunakan untuk proses PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Buffer PCR

Buffer PCR yang digunakan berkaitan dengan pH dan kapasitas buffer nya. Dalam perdagangan ada dua jenis buffer PCR yaitu “*Low-salt buffer*” (pH 8,75 dan kapasitas buffer rendah) dan “*High-salt buffer*” (pH 9,2 dan kapasitas buffer tinggi). Umumnya buffer PCR tersedia sesuai dengan jenis polimerase DNA nya.

Penggunaan jenis buffer ini tergantung pada DNA target yang akan diamplifikasi. Panjang DNA target antara 0–5 bp biasanya diperlukan “*low-salt buffer*” sedangkan untuk panjang DNA target lebih besar dari lima kilobasa digunakan “*high salt buffer*” (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

4. Waktu

Pemilihan waktu yang digunakan berkaitan dengan proses denaturasi DNA templat, *annealing* dan ekstensi primer. Denaturasi DNA *template* umumnya dilakukan selama 30–90 detik, ini semua tergantung pada DNA *template* yang digunakan. Waktu denaturasi yang terlalu lama akan merusak *template* DNA dan sekaligus dapat menurunkan aktivitas polimerase DNA. Sedangkan waktu denaturasi yang terlalu pendek akan menyebabkan proses denaturasi tidak sempurna. Penentuan waktu untuk proses *annealing* berkaitan dengan panjang primer. Untuk panjang primer 18–22 basa cukup dengan 30 detik, sedangkan untuk panjang primer lebih besar dari 22 basa diperlukan waktu *annealing* 60 detik (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Dalam Proses PCR melibatkan beberapa tahapan yaitu:

1. Pra-denaturasi DNA *template*

Dilakukan selama 1-9 menit di awal reaksi untuk memastikan kesempurnaan denaturasi dan mengaktifasi DNA *Polymerase* (jenis hot-start atau baru aktif kalau dipanaskan terlebih dahulu)

2. Denaturasi DNA *template*

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit, untuk meyakinkan

bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktifitas enzim Taq polymerase. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5; 95 dan 97,5°C (Yusuf, 2010).

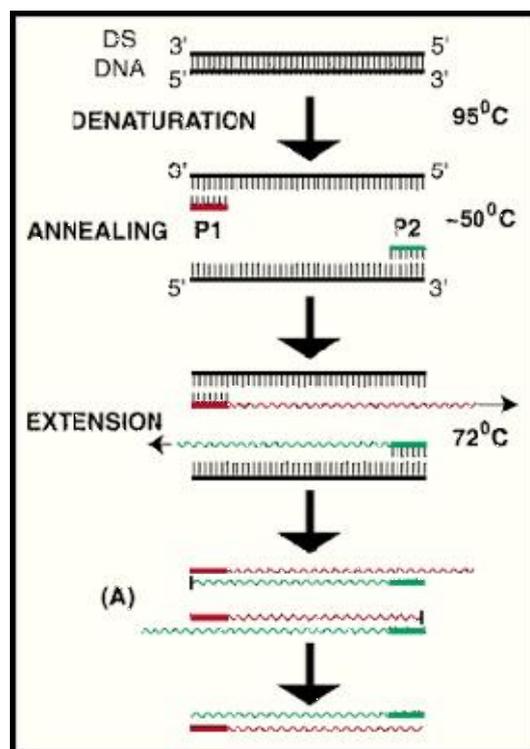
3. Penempelan primer pada *template* (*annealing*)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18–25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C dan untuk kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA dalam masing-masing primer itu sendiri juga sebaiknya tidak saling berkomplemen, karena hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36°C sampai dengan 72°C, namun suhu yang biasa dilakukan itu adalah antara 50–60°C (Yusuf, 2010).

4. Pemanjangan primer (*extension*)

Selama tahap ini taq polymerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35–100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk produk PCR dengan panjang 2000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup

untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda (Yusuf, 2010).



Gambar 2. Tahapan Reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Nuruddin Khoiri, 2013).

Selanjutnya komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah:

1. *Template* DNA

Fungsi *template* DNA yaitu sebagai cetakan dalam pembentukan molekul DNA yang sama. Untuk memperoleh DNA *template* untuk proses PCR maka harus menggunakan metode lisis sel atau mengisolasi baik DNA kromosom maupun DNA plasmid juga menggunakan metode isolasi dengan standar yang ada (Fatchulloh, 2013).

2. Primer

Pada primer dalam keberhasilan proses PCR sangat penting karena berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diaplikasikan dan sekaligus menyediakan gugus hidroksi (OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk proses eksistensi DNA serta dalam menentukan spesifitas dan sensitivitas PCR. Pasangan primer terdiri dari dua oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida (Fatchulloh, 2013).

Spesifitas PCR sangat tergantung pada suhu melting (T_m) primer, yaitu suhu dimana separuh jumlah primer *annealing* pada *template*. Hasil T_m yang baik apabila T_m kedua primer serupa di atas 60°C . Konsentrasi optimal dari primer antara $0,1\text{--}0,5\ \mu\text{M}$. Apabila konsentrasinya terlalu tinggi maka akan terjadi beberapa akibat diantaranya yaitu mispriming (penempelan pada tempat yang tidak spesifik), akumulasi produk non spesifik, serta meningkatkan resiko terjadinya *primer-dimer*. Sebaiknya apabila konsentrasinya terlalu rendah maka PCR menjadi tidak efisien dan hasilnya rendah (Fatchulloh, 2013).

3. *Deoxynucleotide triphosphates* (dNTPs)

Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) terdiri dari *Deoksiadenosin trifosfat* (dATP), *Deoksitimidin trifosfat* (dTTP), *Deoksisitidin trifosfat* (dCTP). Campuran dari bahan-bahan tersebut digunakan untai DNA komplementer. Konsentrasi masing masing dNTP harus seimbang karena untuk meminimalisir kesalahan penggabungan serta untuk meningkatkan spesifitas dan kepekaan PCR. Dalam memperoleh hal itu maka konsentrasi dNTP harus lebih rendah, karena dapat

meminimalkan mispriming pada daerah non target dan mencegah terjadinya perpanjangan nukleotida yang salah (Fatchulloh, 2013).

4. Buffer PCR dan MgCl₂

Buffer dibutuhkan pada proses PCR karena untuk menjamin pH medium. Selain buffer juga diperlukan ion Mg²⁺ dimana ion tersebut berasal dari MgCl₂. Dalam menstimulasi aktifitas DNA polymerase maka dibutuhkan MgCl₂ yang bertindak sebagai kofaktor sehingga dapat meningkatkan interaksi antara primer dengan *template* yang membentuk kompleks larut dengan dNTP (Fatchulloh, 2013).

5. DNA *polymerase*

DNA *polymerase* merupakan enzim yang dapat mengkatalis polymerase DNA. Enzim ini mempunyai aktivasi exonuklease dari 5' ke 3', akan tetapi tidak mempunyai aktivasi exonuklease dari 3' ke 5'. Konsentrasi yang dibutuhkan PCR biasanya 0,5-2,5 unit. Jumlah enzim yang terlalu tinggi maka akan terjadi akumulasi produk non spesifik. Sebaliknya apabila jumlah enzim terlalu rendah maka produk yang diinginkan sedikit (Fatchulloh, 2013).

Penelitian menggunakan metode PCR memiliki keunggulan tingkat sensitifitas, efisien dan keakuratannya yang cukup tinggi (Budiarto, 2015) sehingga banyak peneliti menggunakan metode ini untuk deteksi produk rekayasa genetika. Sebagai contoh pada penelitian identifikasi gen transgenik EPSPS-CP4 dan CaMV 35S (Wardani dkk., 2017) dan deteksi PRG pada Jagung Event BT11 dan GA21 (Bahagiawati, 2014).

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Kultur In Vitro Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan mulai September 2018 – April 2019.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 10 sampel, meliputi 6 sampel kedelai impor dan 4 sampel kedelai lokal. Primer yang digunakan yaitu primer target sekuen EPSPS-CP4. Bahan reagen ekstraksi menggunakan *genomic* DNA mini kit plant (*Catalogue number*: GP100, 2019), etanol absolut, etanol 70%. Elektroforesis menggunakan agarosa, EtBr (*Ethidium Bromide*), *loading dye*, marker 50 bp, TAE buffer dan ddH₂O. Bahan PCR menggunakan master mix gotag green, nuclease-free water dan DNA *template*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) BIO RAD, seperangkat alat DNA elektroforesis BIO RAD dan *GeneQuant* Spektrofotometer, *waterbath*, autoklaf, *microwave*, timbangan analitik, *glassware*, *microcentrifugase*, kulkas, mortal dan alu, mikropipet, mikro tip dan UV *transiluminator*.

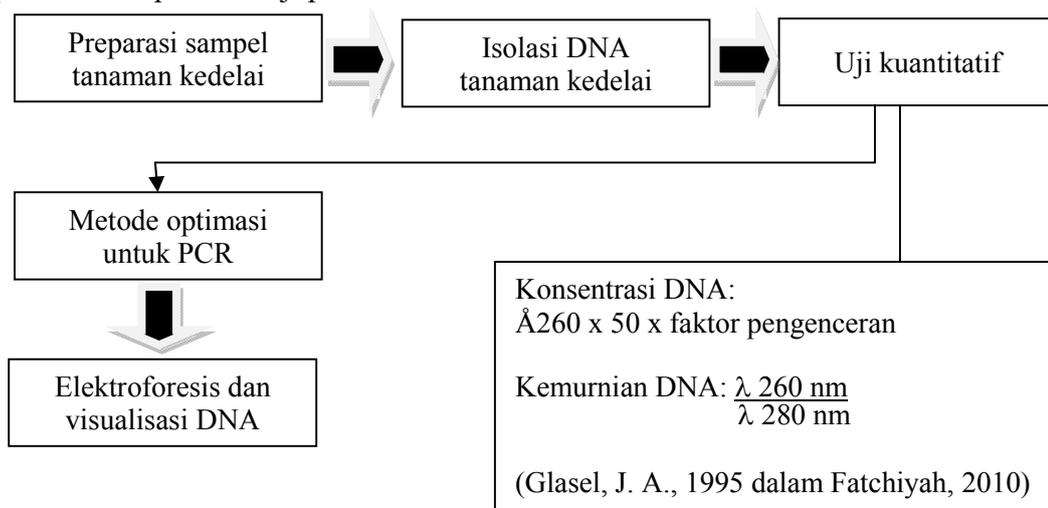
C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan merupakan metode observasi yang dilakukan di laboratorium tentang isolasi DNA dan deteksi gen EPSPS-CP4 dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada tanaman kedelai (*Glycine*

max) dengan pengambilan sampel menggunakan purposive sampling. Hidayat (2017) menjelaskan purposive sampling merupakan salah satu teknik sampling non random sampling dimana peneliti menentukan pengambilan sampel dengan cara menetapkan cirri-ciri khusus yang sesuai dengan tujuan penelitian sehingga diharapkan dapat menjawab permasalahan penelitian. Kedelai diperoleh dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta, meliputi pasar Sentral; Beringharjo; Prawirotaman dan Gamping serta kedelai dari Unit Pelaksana Teknis (UPT) Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jawa Timur yaitu kedelai Anjasmoro.

D. Tata Laksana Penelitian

Alur kerja yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu: (1) Preparasi sampel, (2) Isolasi DNA, (3) Uji kuantitatif DNA, (4) Metode optimasi untuk PCR, (5) Elektroforesis dan visualisasi DNA. Tahapan penelitian seperti tersaji pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Tahapan Penelitian Deteksi Gen EPSPS-CP4 dengan Metode PCR pada Tanaman Kedelai dari Pasar Induk di Daerah Istimewa Yogyakarta

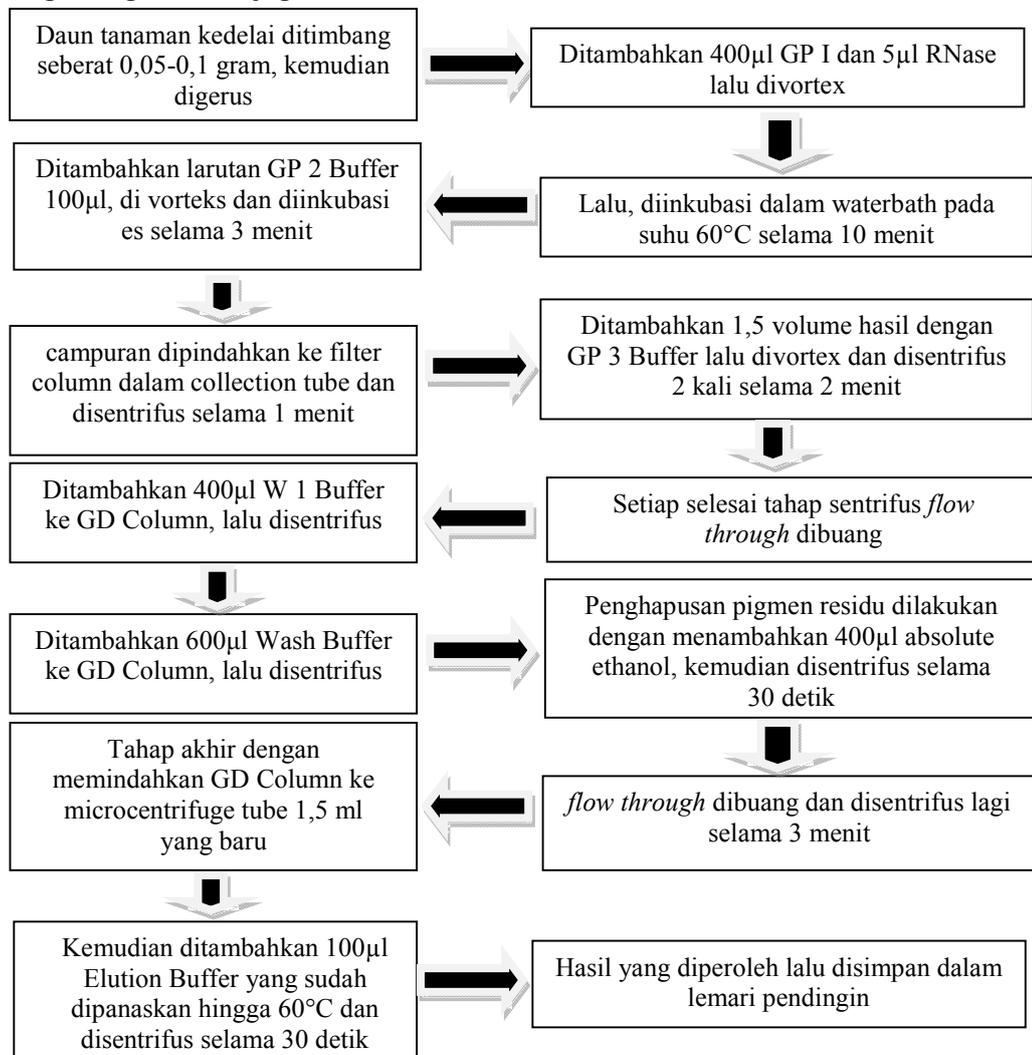
1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menanam biji kedelai dalam polibag berukuran 40x40 cm hingga 2 minggu. Masing-masing polibag berisi 2 biji. Setelah berumur 2 minggu, tanaman kedelai diambil daunnya untuk dilakukan isolasi DNA (Lampiran 1).

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode kit yang memiliki

tahapan seperti tersaji pada Gambar 4:



Gambar 4. Tahapan Isolasi DNA Tanaman Kedelai Menggunakan Metode Kit (Catalogue number: GP100, 2019)

3. Uji Kuantitatif DNA

DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh. Referensi diatur dengan menggunakan ddH₂O. Faktor pengencer (ddH₂O) sebanyak 1998 µl dan DNA 2 µl dimasukkan dalam kurvet. Kurvet yang berisi cairan kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk diukur penyerapan cahaya pada panjang gelombang 260 nm sehingga diketahui DNA dan rasio DNA-RNA (GeneQuant™ 1300 *catalogue number*: 28-9182-13, 2019).

4. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Kegiatan awal yang dilakukan untuk PCR adalah optimasi suhu yang efektif agar menghasilkan pita polimorfik. Optimasi dilakukan dengan menggunakan primer RRS0t. Daftar nama dan susunan primer untuk deteksi sekuen EPSPS-CP4 seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Daftar nama dan susunan primer untuk deteksi sekuen EPSPS-CP4

No	Nama Primer	Susunan primer	Jumlah basa	Panjang DNA yang terdeteksi
1	RRS0t-5 (f)	5'CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TG-3'	23 basa	121 bp
2	RRS01-3 (r)	5'GAC TTG TCG CCG GGA ATG-3'	18 basa	

(Tung, dkk., 2008).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi berantai polymerase (PCR) untuk menggandakan sekuens DNA berdasarkan primer yang digunakan. Amplifikasi DNA dilakukan dengan *thermal clycer*. Tabel 3 menyajikan tahapan reaksi amplifikasi DNA.

Tabel 3. Tahapan Reaksi Amplifikasi DNA Optimasi Suhu *Annealing* Menggunakan PCR

No	Tahapan Reaksi	Suhu Reaksi (°C)	Lama Reaksi (menit)
1	<i>Pre-heating</i>	95	4:00
2	Denaturasi	95	1:00
3	<i>Annealing</i>	Suhu terpilih	1:00
4	Elongasi	72	1:30
5	Elongasi akhir	72	7:00

(Yusuf, 2010).

Optimasi suhu penempelan primer dilakukan pada suhu 55°C, 56°C, 58°C, 59°C dan 60°C. Selanjutnya dipilih satu suhu sebagai suhu penempelan primer (*annealing*) yang menghasilkan pita paling terang.

5. Elektroforesis dan Visualisasi DNA

Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis gel dalam tegangan 100 volt selama 55 menit menggunakan 1,5% (0,45 gram/30 ml) gel agarosa di dalam tangki elektroforesis gel yang berisi penyangga TBE 1x pH 8 yang dipanaskan dalam *microwave* sampai terlarut sempurna kemudian ditambahkan dengan pewarna DNA (*Fluorescent DNA Staining*) sebanyak 5 µl, ladder 50 bp dan DNA *template* 10 µl. Selanjutnya gel agarosa diangkat dari tangki elektroforesis dan divisualisasi menggunakan sinar UV dan difoto dengan kamera digital (Yuwono, 2005).

E. Variabel yang Diamati

1. Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Isolasi DNA

Produk hasil isolasi DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer (GeneQuant™ 1300 *catalogue number*: 28-9182-13, 2019) untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh. Konsentrasi DNA dihitung

berdasarkan hasil absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 dengan formula $A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$. Nilai kemurnian DNA dilihat pada serapan cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini maka kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan absorbansi 280 nm, dan nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 (Fatchiyah, 2010).

2. Deteksi Gen EPSPS-CP4

Deteksi gen EPSPS-CP4 dilakukan dengan visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan metode elektroforesis. Pita DNA hasil elektroforesis yang tampak pada UV transiluminator dibandingkan dengan marker DNA dan selanjutnya di skoring, jika muncul pita nilai 1 dan jika tidak muncul pita nilai 0 (Yuwono, 2005).

F. Analisis Data

Data hasil isolasi DNA dan deteksi gen EPSPS-CP4 dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada tanaman kedelai (*Glycine max*) dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel hasil kuantifikasi DNA dan visualisasi gambar pita DNA dengan skoring jika muncul pita nilai 1 dan tidak muncul pita nilai 0.

II. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakter Fenotip Kedelai Impor dan Lokal

Berdasarkan hasil survei yang telah dilakukan, terdapat dua kelompok kedelai yang beredar di pasaran yaitu kedelai impor dan kedelai lokal. Menurut pengelompokan pasar berikut kenampakan biji kedelai impor dan lokal dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kenampakan Biji Kedelai Hasil Survei dari Pasar Induk Daerah Istimewa Yogyakarta

No	Lokasi Pengambilan Sampel	Kode Sampel Kedelai	Keterangan	Kelompok Kedelai
1	Pasar Sentral	Kedelai No Name 1	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
2	Pasar Sentral	Kedelai No Name 2	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
3	Pasar Sentral	Kedelai Amerika	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
4	Pasar Prawirotaman	Kedelai No Name 1	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
5	Pasar Prawirotaman	Kedelai No Name 2	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
6	Pasar Prawirotaman	Kedelai No Name 3	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
7	Pasar Prawirotaman	Kedelai Lokal	Biji besar, warna kuning mengkilat	Lokal
8	Pasar Beringharjo	Kedelai Amerika No 1	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
9	Pasar Beringharjo	Kedelai Amerika No 2	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
10	Pasar Beringharjo	Kedelai Lokal Wonosari	Biji besar, warna kuning mengkilat	Lokal
11	Pasar Beringharjo	Kedelai Galunggung	Biji besar, warna kuning mengkilat	Lokal
12	Pasar Gamping	Kedelai Amerika	Biji kecil, warna kuning pucat,	Impor
13	Pasar Gamping	Kedelai Lokal Wonosari	Biji besar, warna kuning mengkilat	Lokal
14	UPT Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jatim	Kedelai Anjasmoro	Biji besar, warna kuning mengkilat	Lokal

Visualisasi karakter fenotip biji kedelai lokal dan impor dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Karakter Fenotip Biji Kedelai Impor dan Lokal Dari Pasar Induk Daerah Istimewa Yogyakarta

Berdasarkan Tabel 4, dapat dikelompokkan bahwa kenampakan biji kedelai impor mempunyai biji kecil dan warna kuning pucat. Sedangkan kedelai lokal mempunyai ukuran biji lebih besar dan warna lebih kuning mengkilat didukung dengan visualisasi karakter fenotip yang disajikan pada Gambar 5. Dapat dilihat bahwasanya kedelai impor lebih banyak ditemukan di pasar daripada kedelai lokal. Hal ini menunjukkan bahwa kedelai yang beredar di pasaran berpotensi besar diduga kedelai yang telah tersisipi gen transgenik.

Biji kedelai hasil survei ditanaman untuk mendapatkan daun dan diisolasi. Selanjutnya daun diisolasi untuk mendapatkan DNA sampel sebagai sampel uji. Dari 14 kedelai yang didapatkan dari berbagai pasar terdapat 10 kedelai yang bisa tumbuh dan 4 kedelai tidak tumbuh atau mati.

B. Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Isolasi DNA

Keberadaan DNA pada penelitian ini diketahui secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran kuantitatif isolasi DNA dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA Sampel

Kode Sampel	A260/280	A230/260	Konsentrasi (ng/ μ l)
1.	3,00	3,00	300
2.	1,33	2,00	400
3.	1,00	2,00	200
4.	2,00	2,00	200
5.	2,00	2,00	400
6.	3,00	1,50	300
7.	1,00	1,00	200
8.	2,00	1,00	200
9.	1,00	2,00	400
10.	1,33	0,80	400

Keterangan :

Sampel 1 : Kedelai Amerika No 1 (Pasar Beringharjo)

Sampel 2 : Kedelai Amerika No 2 (Pasar Beringharjo)

Sampel 3 : Kedelai Amerika (Pasar Gamping)

Sampel 4 : Kedelai Amerika (Pasar Sentral)

Sampel 5 : Kedelai No Name 1 (Pasar Prawirotaman)

Sampel 6 : Kedelai No Name 2 (Pasar Prawirotaman)

Sampel 7 : Kedelai Lokal (Pasar Prawirotaman)

Sampel 8 : Kedelai Galunggung (Pasar Beringharjo)

Sampel 9 : Kedelai Wonosari (Pasar Gamping)

Sampel 10 : Kedelai Anjasmoro (Jawa Timur)*

* (UPT Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jatim)

Dalam penelitian ini menunjukkan hasil nilai kemurnian isolasi DNA sampel berkisar antara 1,00-3,00 pada A260/280 dan A230/260. Menurut Ludyasari (2014) kemurnian DNA ditunjukkan dari banyaknya jumlah DNA yang tidak terkontaminasi dalam larutan sampel. Perhitungan tingkat kemurnian DNA dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Larutan DNA murni dapat menyerap sinar UV dengan optimal, sedangkan pada panjang 280 nm protein dapat menyerap sinar UV dengan maksimal (Muladno, 2002). Kemurnian dikatakan tinggi apabila rasio pada A260/280 memiliki nilai 1,80-2,00 dan A260/230 memiliki nilai 1,80-2,20. Apabila nilai kemurnian DNA memiliki nilai kurang dari 1,80 mengindikasikan DNA

terkontaminasi oleh protein atau fenol dan apabila nilai lebih dari 2,00 menunjukkan bahwa DNA tidak murni karena terkontaminasi oleh RNA (Fatchiyah, 2010).

Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa kedelai Amerika (sampel no 4), kedelai No Name 1 (sampel no 5) dan Galunggung (sampel no 8) memiliki nilai 2,0 yang menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA tinggi, murni dan tidak terkontaminasi oleh protein maupun RNA. Fatchiyah (2010) menyebutkan bahwa apabila DNA memiliki tingkat kemurnian yang tinggi maka dapat digunakan untuk penelitian molekuler lainnya, sedangkan DNA yang tidak murni dapat mengganggu proses penempelan primer dan menghambat aktivitas enzim *polymerase* DNA pada proses PCR.

Nilai kemurnian DNA A260/280 dibawah 1,80 adalah kedelai Amerika No 2 (sampel no 2) dan kedelai Anjasmoro (sampel no 10) dengan nilai 1,33 dan kedelai Amerika (sampel no 3), kedelai lokal (sampel no 7) dan kedelai Wonosari (sampel no 9) dengan nilai kemurnian adalah 1,00. Nilai tersebut menunjukkan angka yang terindikasi bahwa DNA tidak murni, terkontaminasi oleh protein atau fenol. Kemurnian DNA yang masih rendah dimungkinkan karena *buffer* yang digunakan kurang efektif dalam mendegradasi protein dan sisa senyawa metabolit sekunder pada tanaman kedelai. Salah satu dari kekurangan penggunaan kit DNA adalah *buffer* yang tersedia hanya didesain untuk tanaman yang memiliki metabolit sekunder dan polisakarida yang rendah (Sari, dkk., 2009).

Pada kedelai Amerika No 1 (sampel no 1) dan kedelai No Name 2 (sampel no 6) menunjukkan nilai diatas 2,00 yang menunjukkan bahwa DNA telah

terkontaminasi oleh RNA. Kontaminan RNA disebabkan karena tidak adanya atau kurang tepatnya konsentrasi penambahan enzim RNase yang berfungsi untuk mendegradasi RNA. Enzim RNase dalam proses isolasi DNA berfungsi untuk mengurangi kontaminasi RNA (Sari dan Wardani, 2015).

Pada absorbansi A_{230/260} kedelai Amerika No 2 (sampel no 2), kedelai Amerika (sampel no 3), kedelai Amerika (sampel no 4), kedelai No Name 1 (sampel no 5) dan kedelai Wonosari (sampel no 9) menunjukkan nilai 2,00. Berdasarkan Fatchiyah (2010) menunjukkan bahwa DNA tersebut memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dengan batas maksimal nilai absorbansi pada 2,20. Pada sampel no 1 nilainya menunjukkan pada angka diatas 2,20 yaitu 3,00. Hal ini mengindikasikan bahwa DNA telah terindikasi terkontaminasi. Pada kedelai No Name 2 (sampel no 6), kedelai Lokal (sampel no 7), kedelai Galunggung (sampel no 8) dan kedelai Anjasmoro (sampel no 10) nilai dibawah 1,8 yang artinya DNA memiliki tingkat kemurnian yang rendah dan telah terkontaminasi dengan zat lain.

Konsentrasi DNA menunjukkan nilai yang beragam. Konsentrasi terendah pada kedelai Amerika (sampel no 3), kedelai Amerika (sampel no 4), kedelai Lokal (sampel no 7) dan kedelai Galunggung (sampel no 8) yaitu 200 ng/μl. Kedelai Amerika No 1 (sampel no 1) kedelai No Name 2 (sampel no 6) nilai konsentrasi 300 ng/μl. Sedangkan sampel dengan nilai tertinggi 400 ng/μl pada kedelai Amerika No 2 (sampel no 2), kedelai No Name 1 (sampel no 5), kedelai Wonosari (sampel no 9) dan kedelai Anjasmoro (sampel no 10). Konsentrasi DNA ini digolongkan tinggi sesuai dengan protokol yang digunakan dalam

penelitian ini yaitu <250ng untuk reaksi volume 25 µl. Sehingga hasil kuantifikasi DNA pada semua sampel bisa digunakan untuk tahap molekuler selanjutnya.

C. Deteksi Gen EPSPS-CP4

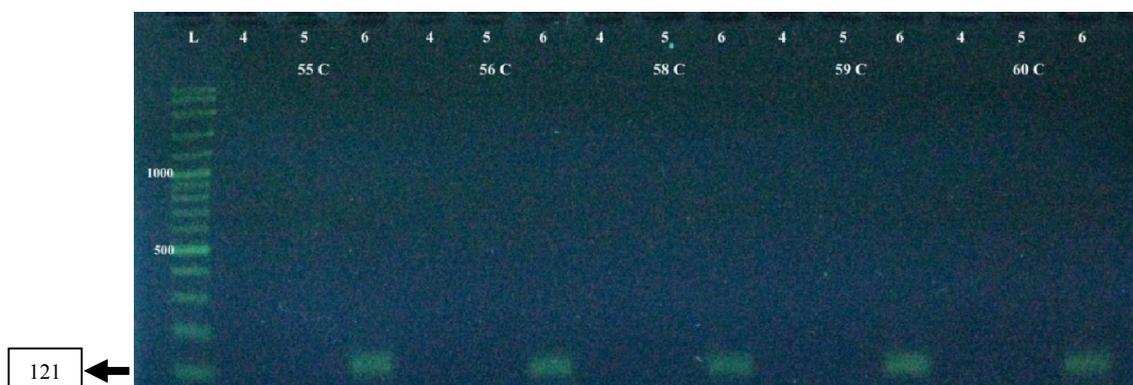
Gen EPSPS (*3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase*) merupakan gen dari mutan *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 yang disisipkan kedalam tanaman agar tahan terhadap herbisida glifosat. Tanaman tahan herbisida glifosat resisten ketika disemprot herbisida glifosat karena transgene EPSPS dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang telah disisipkan tidak dapat diikat oleh glifosat sehingga gen tersebut tetap memproduksi asam amino aromatik dan tanaman tetap tumbuh dengan baik (Duke dan Powles, 2008).

Tanaman yang tidak disisipi oleh gen EPSPS-CP4 tidak akan mampu bertahan hidup jika terkena herbisida. Hal ini karena herbisida menghentikan kerja EPSPS, enzim yang berperan penting dalam mensintesis asam amino aromatik *tyrosine*, *phenilalanin* dan *tryptohan* yang dapat memblok protein untuk biosintesis asam amino aromatik pada tanaman. Tanpa enzim EPSPS tanaman tidak dapat memproduksi protein yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan menyebabkan tanaman menguning dan mati dalam beberapa hari atau minggu setelah penyemprotan herbisida ini (Damayanti, 2014).

Pada penelitian ini, deteksi gen EPSPS-CP4 divisualisasi dari hasil amplifikasi DNA yang menggunakan beberapa tahapan. Tahapan pertama yang dilakukan adalah dengan optimasi PCR. Handoyo dan Rudiretna (2001) menyatakan bahwa optimasi proses PCR perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal. Secara umum optimasi proses PCR dapat dilakukan

dengan cara memvariasikan kondisi yang digunakan pada proses PCR tersebut. Optimasi kondisi berkaitan erat dengan faktor-faktor seperti jenis polimerase DNA; suhu; konsentrasi, dalam hal ini berkaitan dengan dNTPs, MgCl₂ dan DNA polimerase; buffer PCR dan waktu. Dalam penelitian ini, optimasi yang dilakukan yaitu optimasi suhu *annealing*.

Optimasi suhu *annealing* dilakukan untuk mendapatkan suhu yang efektif pada primer target sekuen gen EPSPS-CP4 yaitu primer RRS0t untuk menghasilkan pita polimorfik. Pasangan primer RRS0t-5 (*forward*) dan RRS0t-3 (*reverse*) memiliki area amplifikasi sebesar 121 bp mengacu pada Tung, dkk., (2008). Optimasi suhu *annealing* penempelan primer yang dilakukan yaitu pada suhu 55°C, 56°C, 58°C, 59°C dan 60°C dengan 32x siklus. Hasil visualiasi optimasi suhu *annealing* PCR tersaji pada Gambar 6.



Gambar 6. Visualisasi Optimasi Suhu *Annealing* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada 55°C, 56°C, 58°C, 59°C dan 60°C dengan konsentrasi gel agarose 1,5%

Keterangan :

L : Marker

No 4, 5, 6 : DNA sampel

Berdasarkan hasil visualiasi pada Gambar 6, primer gen EPSPS-CP4 dapat mengamplifikasi secara spesifik pada salah satu sampel yang dijadikan sebagai sampel uji optimasi suhu *annealing* PCR. Hal ini ditunjukkan dengan

adanya pita DNA yang terlihat jelas dan nyata. Pita DNA terlihat pada semua suhu yang dicobakan. Dari hasil optimasi suhu *annealing* yang dipilih untuk PCR yaitu pada suhu 58°C karena pita DNA terlihat lebih jelas dibanding suhu lainnya. Selanjutnya dijadikan acuan suhu *annealing* PCR.

Tahap selanjutnya yang dilakukan setelah optimasi suhu *annealing* PCR adalah melakukan PCR pada semua sampel dan dilakukan elektroforesis serta visualisasi DNA. Tahapan Reaksi Amplifikasi DNA pada PCR tersaji pada Tabel 6 dengan volume PCR 10 µl:

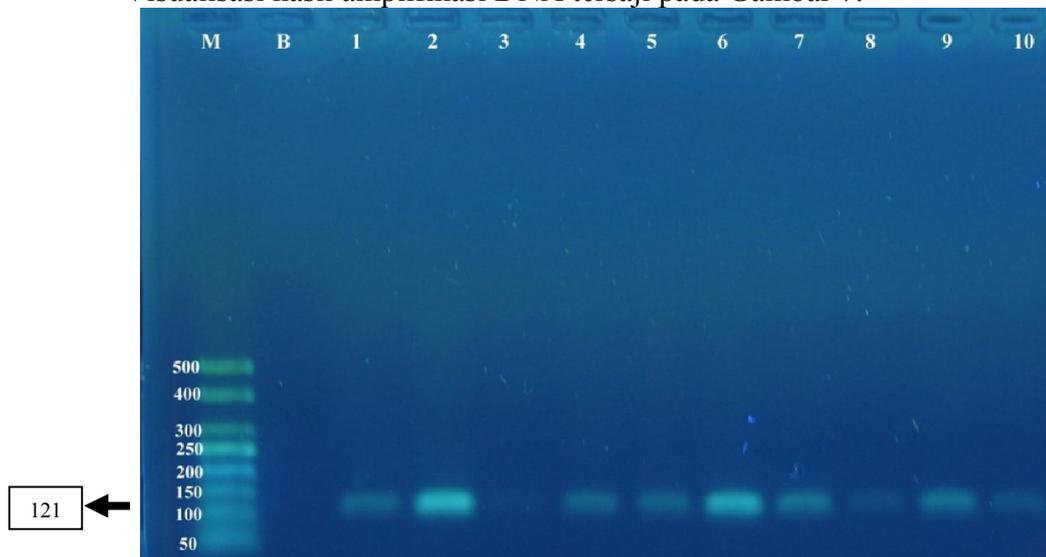
Tabel 6. Tahapan Reaksi Amplifikasi DNA Menggunakan PCR

No	Tahapan Reaksi	Suhu Reaksi (°C)	Lama Reaksi (menit)	Jumlah Siklus
1	<i>Preparation</i>	95	4:00	34 X
2	Denaturasi	95	1:00	
3	<i>Annealing</i>	58	1:00	
4	Elongasi	72	1:30	
5	Elongasi Akhir	72	7:00	

Visualisasi DNA dilakukan dengan metode elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode pemisahan yang memanfaatkan medan listrik yang dihasilkan dari elektroda-elektroda untuk memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki muatan berupa kation maupun anion (Harahap, 2018). Visualisasi dilakukan dibawah sinar UV. Hasil visualisasi amplifikasi DNA menunjukkan pita-pita polimorfik yang sesuai dengan target sekuen yang diinginkan. Pita DNA yang baik menunjukkan pita segaris dengan panjang sesuai target, namun jika tidak segaris pita dikatakan smear yang mengindikasikan adanya kontaminasi oleh RNA. Munculnya kontaminan RNA dapat disebabkan oleh kurang maksimalnya

kerja RNase pada tahap purifikasi saat isolasi berlangsung (Murtyaningsih, 2017).

Visualisasi hasil amplifikasi DNA tersaji pada Gambar 7.



Gambar 7. Visualisasi Amplifikasi DNA Tanaman Kedelai dengan Metode PCR menggunakan primer RRS0t-5 (*forward*) dan RRS0t-3 (*reverse*) dengan konsentrasi gel agarose 1,5%

Keterangan :

M : Marker

B : Blank

Sampel 1 : Kedelai Amerika No 1 (Pasar Beringharjo)

Sampel 2 : Kedelai Amerika No 2 (Pasar Beringharjo)

Sampel 3 : Kedelai Amerika (Pasar Gamping)

Sampel 4 : Kedelai Amerika (Pasar Sentral)

Sampel 5 : Kedelai No Name 1 (Pasar Prawirotaman)

Sampel 6 : Kedelai No Name 2 (Pasar Prawirotaman)

Sampel 7 : Kedelai Lokal (Pasar Prawirotaman)

Sampel 8 : Kedelai Galunggung (Pasar Beringharjo)

Sampel 9 : Kedelai Wonosari (Pasar Gamping)

Sampel 10 : Kedelai Anjasmoro (Jawa Timur)*

* (UPT Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jatim)

Berdasarkan hasil skoring pada Lampiran 2, lebih dari 80% responden mengatakan bahwa pita DNA nampak pada semua sampel terkecuali sampel 3. Sampel 3 menunjukkan skoring negatif terdeteksinya gen EPSPS-CP4.

Dalam penelitian ini yang ditunjukkan hasil pada Gambar 7 menunjukkan pita DNA yang dihasilkan dalam gel elektroforesis pada 9 sampel dari 10 sampel

yang diujikan pada panjang pita 121 bp, akan tetapi tidak tampak pita DNA pada kedelai Amerika (sampel no 3).

Kedelai Amerika (sampel no 3) pada penelitian ini tidak muncul pita DNA pada hasil amplifikasi. Namun tidak teramplifikasinya gen EPSPS-CP4 bukan berarti bahwa kedelai tersebut bebas dari rekayasa genetik. Hasil amplifikasi DNA tidak terlihat dapat dikarenakan kurangnya konsentrasi jumlah DNA untuk PCR dan terdegradasinya DNA sampel. Selain itu, terdapat banyak gen asing yang dapat disisipkan ke kedelai rekayasa genetik selain gen yang dideteksi pada penelitian ini, contohnya gen lectin (LEC) (Randhawa dkk., 2006), gen Cry1Ac (Sawazaki dkk., 2015) dan gen pinII (Hadiarto dkk., 2001).

Berdasarkan hasil visualisasi deteksi gen EPSPS-CP4 pada Gambar 7, maka 9 sampel terdeteksi adanya gen EPSPS-CP4. Rahmawati (2011) menyebutkan bahwa jika sampel teramplifikasi pada ukuran pita yang sesuai dengan target sekuen yang diinginkan, sampel tersebut mengandung gen yang dideteksi.

DNA Sampel no 1, 2 dan 4 kedelai Amerika dari pasar Beringharjo dan pasar Gamping terbukti kedelai yang tersisipi gen transgenik EPSPS-CP4. Sampel no 5 dan 6 merupakan kedelai no name yang didapatkan dari pasar Prawirotaman menunjukkan tersisipinya gen transgenik EPSPS-CP4. Sampel no 7, 8 dan 9 merupakan kedelai lokal dari pasar Prawirotaman, Beringharjo, Gamping dan sampel 10 didapatkan dari UPT Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tananaman Pangan dan Hortikultura Jatim, pada penelitian ini terdeteksi adanya gen target.

Keberadaan gen asing yang diduga untuk membuat tanaman transgenik pada kedelai lokal dimungkinkan karena adanya kontaminasi baik di pasar maupun saat budidaya. Menurut Bambang dan Muharsini (2013) petani sudah mulai menanam komoditas tanaman pakan dan pangan salah satunya kedelai hasil rekayasa genetika Monsanto, sebagai percobaan kepada petani dan diharapkan dapat menimbulkan kepercayaan bahwa produk rekayasa genetika termasuk kedelai tidak memberikan dampak buruk dan membahayakan. Dari kondisi ini, diasumsikan bahwa benih kedelai lokal yang dimiliki petani sudah bercampur atau terkontaminasi dengan benih kedelai lokal baik pada budidaya ataupun pemasaran yang sampai saat ini belum adanya pelabelan PRG (Produk Rekayasa Genetika).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji kuantitatif hasil isolasi DNA tanaman kedelai (*Glycine max*) dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta menghasilkan nilai kemurnian isolasi DNA yang beragam pada sampel berkisar antara 1,00-3,00 pada A260/280 dan A230/260 dengan konsentrasi berkisar antara 200 ng/ μ l - 400 ng/ μ l.
2. Gen EPSPS-CP4 terdeteksi pada kedelai lokal dan impor, yaitu: kedelai Amerika No 1 dan 2, kedelai Amerika, kedelai No Name 1 dan 2, kedelai Galunggung, kedelai Wonosari dan kedelai Anjasmoro.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh data yang lengkap. Salah satunya dapat dilakukan dengan penelitian uji skuensing guna mengetahui keberadaan urutan basa gen EPSPS-CP4 sebagai data verifikasi untuk selanjutnya dapat digunakan sebagai rekomendasi pelabelan pada kedelai yang beredar di pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta.

DAFTAR PUSTAKA

- Andisa, Maria. 2014. *Genotyping*. <http://maria-andisa-fkg13.web.unair.ac.id/artikel.html>. Diakses tanggal 16 September 2018.
- Anonim. 2019. Gambar Habitus Tanaman Kedelai. The Parts of a Soybean Seedling (*Glycine max*, Dicotyledon). <https://www.amnh.org/learn-teach/curriculum-collections/biodiversity-counts/plant-identification/plant-morphology/the-parts-of-a-soybean-seedling-glycine-max-dicotyledon>. Diakses tanggal 01 Juli 2019.
- Bahagiawati. 2014. Pemuliaan Tanaman Dengan Teknologi Rekayasa Genetik dan Potensi Pemanfaatannya di Indonesia. Balai Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Pemuliaan Indonesia (PERIPI). Hal 139 – 14.
- Bambang R Prawiradiputra dan Muharsini S. 2013. Tanaman Pakan dan Bahan Pakan Transgenik di Indonesia. <http://medpub.litbang.pertanian.go.id/index.php/wartazoa/article/download/1006/1019>. Diakses tanggal 01 Agustus 2019.
- BPS (Badan Pusat Statistik). 2018. Rata-rata Konsumsi Per Kapita Seminggu Beberapa Macam Bahan Makanan Penting. <http://www.bps.go.id/statictable/2014/09/08/950/rata-rata-konsumsi-per-kapita-seminggu-beberapa-macam-bahan-makanan-penting-2007-2017.html>. Diakses tanggal 08 September 2018.
- Budiarto, Bugi Ratno. 2015. *Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan dan Perannya Dalam Diagnostik kesehatan*. BioTrends Vol.6 No. 2. <http://terbitan.biotek.lipi.go.id/index.php/biotrends/article/viewFile>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Catalogue number*: GP100. 2019. Products genomic DNA purification DNA extraction kit plant miniprep. <http://www.geneaid.com/products/genomic-dna-purification/dna-extraction-kit-plant-miniprep>. Diakses tanggal 14 Juli 2019.
- Corkill, G., Rapley, R. 2008. *The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques in Molecular Bio methods Handbook Second Edition*. Ed: Walker, J.M., Rapley, R. Humana Press, NJ, USA.
- Damayanti, Diana. 2014. Tanaman PRG Toleran Herbisida Glyphosate. *Warta Biogen* Vol. 10, No. 1, April 2014. Hal 11.
- Duke, S. O. dan S. B. Powles. 2008. Mini-Review Glyphosate: a Once-in-a-Century Herbicide. *Society of Chemical Industry. University MS USA. Pest Management Science* 64: 319 – 325.

- Faatih, Mukhlissul. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom Isolation and Digestion Of Chromosomal DNA <https://publikasiilmiah.ums.ac.id/bitstream/handle/11617/432/7.%20FA%20TIH.pdf;sequence=1>. Diakses tanggal 12 September 2018.
- Fatchiyah. 2010. Uji Kualitatif dan Kuantitatif DNA dan RNA. <http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/files/2010/03/Uji-kualitatif-dan-kuantitatif-DNA-dan-RNA-2010>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Fatchulloh. 2013. Prinsip Umum Dalam Pelaksanaan PCR. http://repository.ump.ac.id/469/3/bab%20IIHendri%20Dinnur%20fatchulloh_Farmasi%2713.pdf. Diakses tanggal 11 September 2018.
- GeneQuant™ 1300 *catalogue number*: 28-9182-13. 2019. GeneQuant 1300. <https://www.biocompare.com/22960-Spectrophotometers-Single-Beam/466476-GeneQuant-1300-Classic/>. Diakses tanggal 14 Juli 2019.
- Hadiarto, T., Utami, T.I.R., Pardal, S.J. dan Herman, M. 2001. Analisis molekuler gen pinii pada tanaman kedelai transgenik R2. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman Bogor 133–140.
- Hadiarto, Toto. 2015. Analisa High-Resolution Melting dan Pemanfaatannya. <http://biogen.litbang.pertanian.go.id/2015/03/analisa-high-resolution-melting-dan-pemanfaatannya/>. Diakses tanggal 16 September 2018.
- Handoyo, Darmo dan Rudiretna, Ari. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). <https://core.ac.uk/download/pdf/11980242.pdf>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Harahap, Muhammad Ridwan. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *Jurnal Ilmiah*, Vol. 2, No. 1, hal. 21-26.
- Hetami, Kamila. 2009. Pelabelan Produk Pangan Yang Mengandung Bahan Rekayasa Genetika Sebagai Wujud Asas Keterbukaan Informasi. Http://Eprints.Undip.Ac.Id/18037/1/Kamila_Hetami.Pdf. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Hidayat, Anwar. 2017. Penjelasan Teknik Purposive Sampling. <https://www.statiskian.com/2017/06/penjelasan-teknik-purposive-sampling.html>. Diakses 20 Juli 2019.
- Ludyasari. 2014. Pengaruh Suhu Annealing Pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah. Skripsi. UIN Malang.
- Marechal, E, Roy, S, Lafanechere, L. 2011. *Chemogenomics and Chemical Genetics*. Heidelberg: Springer-Link, hal. 89.

- Marianah, Lisa. 2012. Teknologi Budidaya Kedelai. Teknologi Budidaya Kedelai Balai Pelatihan Pertanian (BPP) Jambi. <http://www.bppjambi.info/dwnfilemanager.asp>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Muladno. 2002. Seputar Teknologi Rekayasa Genetika. Pustaka Wirausaha Muda. Bogor.
- Murtyaningsih. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetik Nanas Menggunakan RAPD. *Agritrop*, Juni 2017. Volume 15 (1). <http://jurnal.unmuhjember.ac.id>. Diakses tanggal 14 Juli 2019.
- NCBI. 2019. LOC542727 enolpyruvylshikimate phosphate synthase 1 [*Zea mays*]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=epsps-cp4>. Diakses tanggal 14 Juli 2019.
- Nur, M. dan Adijuwana H. 1987. Teknik separasi dalam analisis pangan [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Ozal, Dimasyq. 2012. Ini Perbedaan Kedelai Lokal dengan Impor. <https://regional.kompas.com/read/2012/08/13/10071160/Ini.Perbedaan.Kedelai.Lokal.dengan.Impor>. Diakses tanggal 14 Juli 2019.
- Permana, AS. 2010. Pengertian dan Klasifikasi Pasar. <http://repository.unpas.ac.id/29023/1/bab%2520II.pdf>. Diakses tanggal 19 Juli 2019.
- Priyambodo. 2017. Prinsip, Metode, dan Teknik Isolasi DNA. <http://staff.unila.ac.id/priyambodo/archives/646>. Diakses pada 30 Maret 2019.
- Rahmawati. 2011. Identifikasi Gen Transgenik pada Kedelai Impor dan Tempe di Kota Malang. Skripsi. Universitas Brawijaya, Malang.
- Randhawa, G.J. dan Firke, P.K. 2006. Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction. *Indian Journal of Biotechnology*.
- Rosana, Dadan. 2018. Struktur dan Fungsi DNA dan RNA. <http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/pendidikan/dadan-rosanadr-msi/modul-3-struktur-dan-fungsi-dna-dan-rna1.pdf>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Sari, E.P.K. dan Wardani, A.K. 2015. Deteksi molekuler cemaran daging babi pada bakso sapi di pasar tradisional kota malang menggunakan PCR (*polymerase chain reaction*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(4): 1294–1301. 5: 510–513.

- Sari, S.K., Maziade, M.N., Lystiorini, D., dan Sulasmi, S. 2009. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA Daun Cabai Rawit (*Capsicum frutescens*) Menggunakan Genomic DNA Mini Kit (Plant) Geneaid. Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS.
- Sawazaki, H.E., Duarte, A.P., Fuzatto, M.G., Sawazaki, E., Grandi, S.H.R., Ponte, J.F. dan Nogueira, L. 2015. Identification and quantification of corn, soybean and cotton genetically modified by real-time PCR. *American Journal of Molecular Biology* 5: 84–93.
- Setyeno, Budi. 2010. Peluang Pengembangan Kedelai di Yogyakarta. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta. Prosiding-2010-36-budi.pdf. Diakses pada 30 Maret 2019.
- Sudaryanto, T. 2016. Ekonomi Kedelai di Indonesia. <http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/wpcontent/uploads/2016/03/dele1.tahlim-1.pdf>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Sumarno. 2016. Persyaratan Tumbuh dan Wilayah Produksi Kedelai di Indonesia. <http://balitkabi.litbang.pertanian.go.id/wpcontent/uploads/2016/03/dele4.sumarno-1.pdf>. Diakses tanggal 11 September 2018.
- Tung, N.C.T., Son, R., Raha, A.R., Lai, O.M. dan Clemente M.W.V.L. 2008. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using molecular techniques in food and feed samples from Malaysia and Vietnam. *International Food Research Journal* 15(2): 155–166.
- Wardani, Agustin Krisna, Annisa Arlisyah, Ana Fauziah, Titik Nur Fa'ida. 2017. Identifikasi Gen Transgenik pada Produk Susu Bubuk Kedelai dan Susu Formula Soya dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *AGRITECH*, Vol. 37. Hal. 237-245. <http://doi.org/10.22146/agritech.16656>. Diakses tanggal 10 September 2018.
- Yosephi, Valensa. 2016. DNA. http://eprints.undip.ac.id/50857/3/Valensa_Yosephi22010112140176_Lap.kti_bab_2.pdf. Diakses tanggal 20 September 2018.
- Yusuf, Zuhriana K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR) http://repository.ung.ac.id/get/simlit_res/1/355/Polymerase-Chain-Reaction-PCR.pdf. Diakses tanggal 15 September 2018.
- Yuwono, Triwibowo. 2005. Biologi Molekuler Jakarta. Erlangga.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tanaman Kedelai (*Glycine max*) Sampel



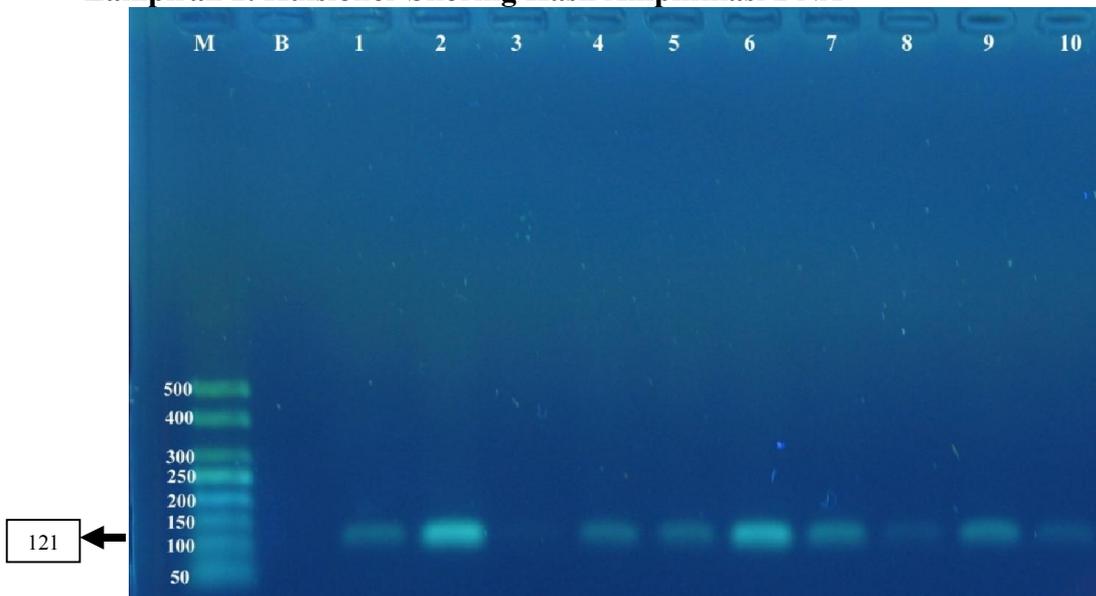
Keterangan :

Sampel 1 : Kedelai Amerika No 1 (Pasar Beringharjo)
Sampel 2 : Kedelai Amerika No 2 (Pasar Beringharjo)
Sampel 3 : Kedelai Amerika (Pasar Gamping)
Sampel 4 : Kedelai Amerika (Pasar Sentral)
Sampel 5 : Kedelai No Name 1 (Pasar Praworotaman)

Sampel 6 : Kedelai No Name 2 (Pasar Prawirotaman)
Sampel 7 : Kedelai Lokal (Pasar Prawirotaman)
Sampel 8 : Kedelai Galunggung (Pasar Beringharjo)
Sampel 9 : Kedelai Wonosari (Pasar Gamping)
Sampel 10 : Kedelai Anjasmoro (Jawa Timur)*

* (UPT Pengawasan & Sertifikasi Benih Tan.Pangan & Hortikultura Jatim)

Lampiran 2. Kuisisioner Skoring Hasil Amplifikasi DNA



No	Nama Responden	Nilai Skoring									
		No Sampel									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Alia Hesti Fadila	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	Alis Diah Kusumawati	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3	Novia Ratna	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4	Anggarsih Triyono	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
5	Rafif Nur Jawoto	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	Foury Azizah	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
7	Firman	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	Atika Farah Dhiba	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	Yana Sinta Wati	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
10	Rafiq Abdul Majid	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
11	Anisa Puji Andani	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
12	Damar Prayogo	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
13	Hidayatul Husna	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
14	Agung Nur Prabowo	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
15	Nandini Ayuningtyas	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
16	Syafira Fitria Hanum	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	Hanifah Amini	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
18	Istiqomah	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
19	Wildan Zaky M	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
20	Rido Illahi	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Keterangan		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

Ketentuan: Kolom setiap sampel diisi angka 1 jika responden menyatakan terdapat pita DNA dan 0 jika responden menyatakan tidak nampak pita DNA.