

IV. 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 1. 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 1. 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 2. 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

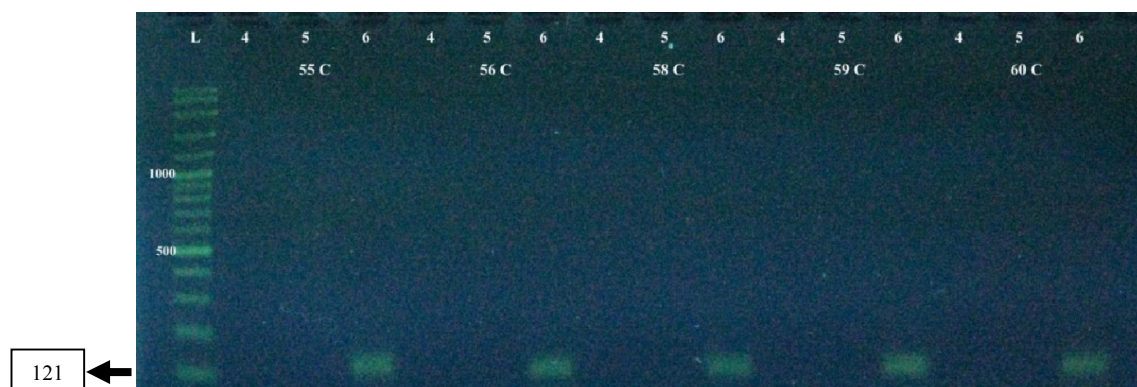
Gen EPSPS (*3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthase*) merupakan gen dari mutan *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 yang disisipkan kedalam tanaman agar tahan terhadap herbisida glifosat. Tanaman tahan herbisida glifosat resisten ketika disemprot herbisida glifosat karena transgene EPSPS dari bakteri *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 2. 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:

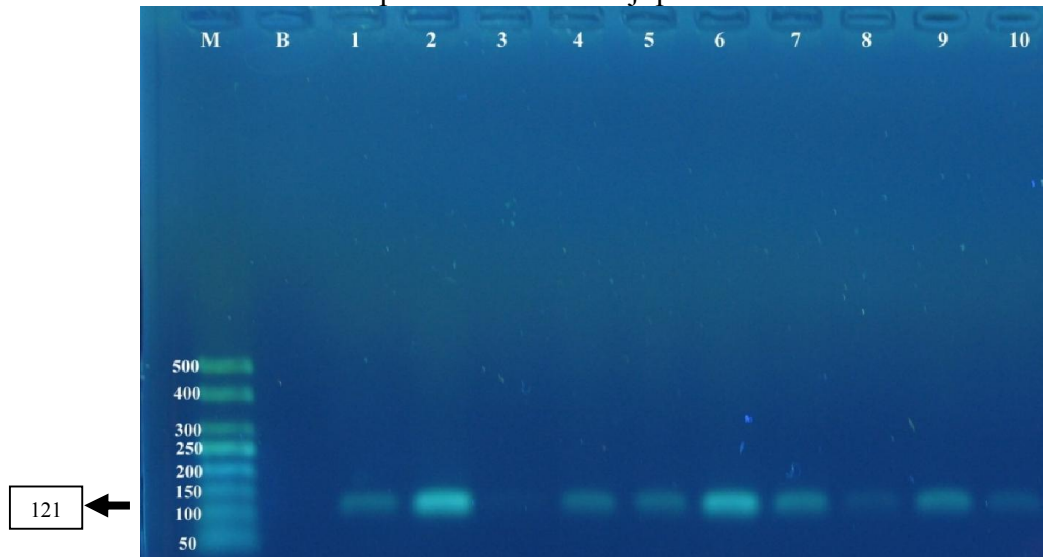
Tabel 3. Tahapan Reaksi Amplifikasi DNA Menggunakan PCR

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