

**ANALISIS FRAGMENT GEN LEKTIN PADA BIJI  
TANAMAN KACANG KEDELAI (*Glycine max*) (L) Merrill  
*DETAM 1 DAN DETAM 2***

**SKRIPSI**

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat  
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



**DEVITYAS ARGIKA PUTRI**

**3425111415**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA  
2016**

PERSETUJUAN PANITIA UJIAN SKRIPSI

ANALISIS FRAGMENT GEN LEKTIN PADA BIJI TANAMAN KACANG  
KEDELAI (*Glycine max*) Detam 1 dan Detam 2

Nama : Devityas Argika Putri

No. Reg : 3425111415

Nama Tanda Tangan Tanggal

**Penanggung Jawab**

Dekan : Prof. Dr. Suyono, M.Si  
NIP. 19671218 199303 1 005

**Wakil Penanggung Jawab**

Pembantu Dekan : Dr. Muktiningsih, M.Si  
NIP. 19640511 198903 2 001

Ketua : Dr. Reni Indrayanti, M.S  
NIP. 19621023 199803 2 002

Sekretaris/Penguji I : Dra. Yulilina Retno, M.Biomed  
NIP. 19640701 199703 2 001

**Anggota**

Pembimbing I : Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed  
NIP. 19681004 200112 2 001

Pembimbing II : Dr. Adisyahputra, M.S  
NIP. 19601111 198703 1 003

Penguji II : Dra. Ernawati, M.Si  
NIP. 19560805 198403 2 003

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 25 Juli 2016

## ABSTRAK

**DEVITYAS ARGIKA PUTRI.** Analisis Fragmen Gen Lektin Pada Biji Tanaman Kacang Kedelai (*Glycine max*) (L) Merril *Detam 1* dan *Detam 2*. Skripsi. Program Studi Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2016.

Kacang kedelai (*Glycine max*) merupakan salah satu tanaman pangan penting di Indonesia. Peningkatan produktivitas kacang kedelai (*Glycine max*) dilakukan melalui perbaikan varietas, salah satu yang umum dilakukan adalah dengan persilangan antara varietas/galur introduksi dengan varietas lokal. Hasil persilangan kacang kedelai varietas/galur introduksi dengan varietas lokal contohnya adalah kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*. Kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* memiliki protein yang paling tinggi dibandingkan kacang kedelai lainnya. Pada kacang kedelai (*Glycine max*) terdapat protein lektin yang dapat berperan sebagai pertahanan diri terhadap patogen, seperti jamur dan bakteri. Berdasarkan hal tersebut, peranan protein lektin dianggap penting, sehingga perlu dilakukan isolasi fragmen gen lektin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui urutan nukleotida gen lektin pada kacang kedelai (*Glycine max*) *Detam 1* dan *Detam 2* serta mengetahui homolog dari gen lektin pada kacang kedelai (*Glycine max*) *Detam 1* dan *Detam 2*. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biokimia, Universitas Negeri Jakarta. Metode yang digunakan adalah metode deskriptif dengan teknik PCR dan elektroforesis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gen lektin terdapat pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387 bp. Hasil penelitian berupa data sekuensing dari masing-masing sampel. Informasi ini dapat dijadikan dasar untuk mendeteksi gen lektin secara utuh dan selanjutnya dapat digunakan sebagai material untuk mengembangkan sekuens ORF bagi upaya insersi gen tersebut pada tanaman yang tidak mengandung protein lektin dan rentan terhadap patogen.

**Kata kunci:** Panjang fragmen gen lektin, PCR, Kacang kedelai *Detam 1*, Kacang kedelai *Detam 2*

## ABSTRACT

**DEVITYAS ARGIKA PUTRI.** Fragment Analysis of Gene Lectine on Soy Bean Seed *Detam 1* and *Detam 2*. Undergraduate Thesis. Department of Biology. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of Jakarta. 2016.

Soy Bean (*Glycine max*) is one of important food plants in Indonesia. The enhancement of soy bean (*Glycine max*) productivity was done through the varieties emendation, one way to have that enhancement is by making intercrossing between the introduction of varieties or furrow and local varieties. The result of the intercrossing the soy bean introduction varieties or furrow and local varieties, for example is the soy bean *Detam 1* and *Detam 2*. The soy bean *Detam 1* and *Detam 2* have the highest protein instead of the others soy beans. In the soy bean (*Glycine max*), there is lectin protein that have function as imune from patogen, like mushroom and bacteria. Based on that fact, the use of lectin protein is considered as an important thing, so that is a must to do the isolation fragment of lectin gene. The purpose of this research are to know the sequence of nukleotida lectin gene on soy bean (*Glycine max*) *Detam 1* and *Detam 2*, and also to know the homolog of lectine gene on soy bean (*Glycine max*) *Detam 1* and *Detam 2*. This research was held in Biokimia Laboratory, State University of Jakarta. The method that used in this research is desciptive methodology with PCR technique and electroforesis. The result of this research is show that lectin gene is contained on soy bean *Detam 1* and *Detam 2* along 387 bp. The result of this research is sequencing dat from each samples. This information can be used as a base to detect lectin gene in their entirety and it can be apply as material to develop ORF sequence to attempt gene insertion in plant which hasn't protein and on the plant embryo which is vulnerable with pathogen.

**Keywords :** Gene lectin fragment, PCR, Soy Bean *Detam 1*, Soy Bean *Detam 2*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya yang selalu menghadirkan rasa tenang dan damai pada hati penulis sehingga skripsi yang berjudul “Analisis Fragmen Gen Lektin Pada Biji Tanaman Kacang Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) *Detam 1* dan *Detam 2*” ini dapat terselesaikan dengan baik dan sesuai dengan ketentuan yang disyaratkan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Penulis menyadari dalam menyelesaikan skripsi ini, banyak pihak yang telah membantu, mendukung, memberikan bimbingan dan doa, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed selaku Pembimbing I dan Dr. Adisyahputra, M.S selaku Pembimbing II, yang telah memfasilitasi penelitian ini serta memberikan masukan ilmu, semangat dan pengarahan kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Yulilina Retno, M. Biomed dan Dra. Ernawati, M.Si selaku dosen penguji atas segala saran, dan masukan dalam penyempurnaan perbaikan skripsi ini.

3. Eka Putri Azrai S.Pd, M.Si. dan Dr. Reni Indrayanti M.Si., selaku Ketua Program Studi Biologi Universitas Negeri Jakarta.
4. Dr. Ratna Komala M.Si. dan Agung Sedayu M.Sc, selaku Kepala Laboratorium jurusan Biologi Universitas Negeri Jakarta.
5. Dr. Reni Indrayanti M.Si., yang telah menjadi Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama masa perkuliahan.
6. Dr. M. Muchlis Adie, M.S. selaku Pemulia Kedelai di BALITKABI Malang yang telah memberikan kesempatan untuk belajar mengenai kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* dan telah memberikan sampel kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* untuk diteliti.
7. Kedua orang tua saya, Bapak Ari Hadiyanto dan Ibu Sugiarti, dan adik-adik saya yang tiada henti memberikan semangat dan dukungan moral serta doa, hingga penulis tetap kuat dan bersemangat dalam menyelesaikan studi.
8. Teman-teman VLDRM 37, UKM UNJ yang selalu memberi semangat selama penulis melakukan penelitian.

Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pembaca dan dapat digunakan sebaik-baiknya.

Jakarta, 25 Juli 2016

Devityas Argika P

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
ABSTRAK .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	3
C. Tujuan .....	4
D. Manfaat .....	4
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR</b>	
A. Kajian Pustaka .....	5
1. Kacang kedelai ( <i>Glycine max</i> ) .....	5
2. Morfologi biji kacang kedelai ( <i>Glycine max</i> ) .....	6
3. Kacang kedelai ( <i>Glycine max</i> ) <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> .....	8
4. Protein lektin kacang kedelai ( <i>Glycine max</i> ) .....	9
5. Desain Primer .....	12
6. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	13
a. Komponen PCR .....	13
b. Tahapan PCR .....	16

B. Kerangka Berpikir.....	18
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
A. Tujuan Operasional.....	19
B. Tempat dan Waktu Penelitian .....	19
C. Metode Penelitian .....	19
D. Prosedur Penelitian .....	20
1. Alat dan bahan .....	20
2. Cara kerja.....	21
a. Pengambilan Sampel Biji Kacang Kedelai .....	21
b. Isolasi DNA Genom Biji Kacang Kedelai.....	22
c. Deteksi DNA Genom Biji Kacang Kedelai .....	23
d. Desain Primer Gen Lektin .....	24
e. Amplifikasi Gen Lektin dengan metode PCR ....	24
f. Elektroforesis hasil PCR .....	26
E. Teknik Analisa Data .....	27
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. DNA Genom Biji Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> .....	28
B. Deteksi Fragmen Gen Lektin Sepanjang 387bp Pada Biji Tanaman Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> .....	31
C. Sekuens Biji Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> .....	36
1. Sekuens Biji Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> dengan Aplikasi <i>Chromas Pro</i> .....	36
2. Sekuens Biji Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> dengan Aplikasi BLAST .....	40



BAB V KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN

A. Kesimpulan .....	47
B. Implikasi .....	47
C. Saran .....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Tanaman Kacang Kedelai ( <i>Glycine max</i> ).....	6
2. Biji Kacang Kedelai ( <i>Glycine max</i> ).....	7
3. Struktur Biji Kacang Kedelai ( <i>Glycine max</i> ).....	8
4. Struktur Gen Lektin .....	10
5. Urutan Asam Amino Lektin .....	12
6. Tahapan PCR .....	17
7. Denah Penempatan Sampel dan DNA Marker Pada Elektroforesis .....	26
8. Pita Positif Pada Sampel .....	32
9. Skema Optimasi Suhu <i>Annealing</i> Program PCR Gradien .....	34
10. Hasil chromatogram	
a. Hasil chromatogram fragmen gen lektin kacang kedelai <i>Detam 1</i> sepanjang 387bp .....	37
b. Hasil chromatogram fragmen gen lektin kacang kedelai <i>Detam 2</i> sepanjang 387bp .....	38
11. Nomor Akses Hasil Penyejajaran Gen Lektin <i>Detam 1</i> , <i>Detam 2</i> dengan Data Gen Lektin pada NCBI.....	42
12. Penyejajaran urutan nukleotida gen lektin	
a. Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai <i>Detam 1</i> sepanjang 387 bp dengan data gen lektin pada NCBI .....	43
b. Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai <i>Detam 2</i> sepanjang 387 bp dengan data gen lektin pada NCBI .....	43

- c. Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 1* sepanjang 387 bp dengan data gen lektin *Phaseolus vulgaris* pada NCBI ..... 44
- d. Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 2* sepanjang 387 bp dengan data gen lektin *Phaseolus vulgaris* pada NCBI ..... 44

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Deskripsi Biji Beberapa Varietas/Galur Kacang Kedelai di Indonesia.....	9
2. Pembuatan Mix PCR .....	25
3. Program PCR .....	26
4. Hasil serapan absorbansi spektrofotometer <i>maestro nanodrop</i> dan konsentrasi DNA genom lektin sepanjang 387 bp. ....	28
5. Komposisi mix PCR .....	31
6. Deretan hasil sekuens dengan NCBI .....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Desain Primer Gen Lektin sepanjang 387 bp .....	52
2. Alat dan bahan penelitian analisis fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> .....	57
3. Grafik Hasil Sekuensing	
a. Grafik Hasil Sekuensing Fragmen Gen Lektin <i>Detam 1</i> Sepanjang 387 pb .....	60
b. Grafik Hasil Sekuensing Fragmen Gen Lektin <i>Detam 2</i> Sepanjang 387 pb .....	61
5. Fragmen Gen Lektin Sepanjang 387 pb pada Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i> disejajarkan dengan data NCBI .....	62
6. <i>Color Key For Alignment Scores</i> Fragmen Gen Lektin sepanjang 387pb pada Kacang Kedelai <i>Detam 1</i> dan <i>Detam 2</i>	63

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kacang kedelai (*Glycine max* (L) Merril) merupakan salah satu tanaman pangan penting di Indonesia setelah beras dan jagung. Kacang kedelai mengandung nilai gizi yang tinggi, harga relatif murah dan ragam kegunaan yang cukup luas untuk dikonsumsi langsung maupun sebagai bahan baku industri pangan dan pakan ternak. Kebutuhan kedelai di Indonesia setiap tahun selalu meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk. Oleh karena itu produktivitas tanaman kacang kedelai perlu ditingkatkan (Rachmawati, 2010).

Peningkatan produktivitas kacang kedelai melalui perbaikan varietas telah dilakukan dengan berbagai cara seperti persilangan, mutasi iradiasi, pemurnian varietas lokal, dan pendayagunaan varietas introduksi. Salah satu hasil persilangan kacang kedelai antara varietas/galur introduksi dengan varietas lokal contohnya adalah kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

Kacang kedelai *Detam 1* merupakan hasil persilangan galur introduksi dengan varietas Kawi dan *Detam 2* merupakan hasil persilangan galur introduksi dengan varietas Wilis. Keduanya merupakan kacang kedelai hitam yang dihasilkan pada tahun 2008, dan memiliki kandungan protein yang tinggi. *Detam 1* dan *Detam 2* telah mampu dikembangkan secara komersial untuk produksi benih dan merupakan bahan utama pembuatan kecap (Fang *et al.*, 2010).

Iklm tropis Indonesia, selain ideal untuk pengembangan sistem pertanian juga merupakan daerah yang subur bagi jamur, bakteri atau patogen yang dapat mengganggu pertumbuhan kacang kedelai sehingga mempengaruhi produktivitas secara alamiah. Pada kacang kedelai terdapat protein lektin yang dapat berperan sebagai pertahanan diri terhadap patogen (Fang *et al.*, 2010). Protein lektin merupakan kelompok protein yang secara spesifik dapat berikatan dengan gugus karbohidrat. Gugus pengikat turunan karbohidrat tersebut berfungsi sebagai hemaglutinin untuk dapat mengikat molekul monosakarida atau oligosakarida yang terdapat pada patogen seperti jamur, virus, dan insekta sehingga dapat berperan sebagai pertahanan kecambah tanaman kacang kedelai. Selain berperan sebagai pertahanan pada tumbuhan, lektin juga berperan sebagai bahan konsumsi diet serta antikanker (Lin, *et al* 2008), sehingga keberadaan protein lektin dianggap penting. Oleh sebab itu, perlu dilakukan isolasi gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*. Pentingnya mengisolasi gen lektin dalam penelitian ini adalah menjadi dasar untuk dilakukan penelitian lanjutan yang berhubungan dengan lektin. Keberhasilan isolasi gen lektin memiliki potensi yang baik untuk diaplikasikan pada tanaman lain yang masih rentan terhadap serangan patogen.

Protein lektin pada kacang kedelai dikode oleh gen LE 1 (NCBI). Isolasi gen LE 1 dianggap penting sebagai langkah utama untuk mendapatkan pengeksresi lektin tersebut. Apabila gen LE 1 sudah didapatkan maka gen tersebut dapat dikonstruksikan untuk memperoleh sekuens sebagai bahan dasar rekayasa genetik pada plasmid bakteri. Plasmid bakteri yang

mengandung konstruksi lektin dalam proses kultivasi memiliki prospek dapat diinfeksi ke dalam embrio tanaman. Jika sudah terinfeksi, selanjutnya dapat berpeluang terinsersi ke dalam kromosom tanaman terinfeksi. Apabila sudah terinsersi diharapkan dapat terjadi transkripsi dan translasi gen lektin pada tanaman tersebut. Maka tanaman penerima akan memiliki ketahanan terhadap pathogen atau penyakit. Penelitian ini masih merupakan langkah awal dengan fokus melakukan isolasi gen lektin.

Menurut Pueppke (1978), protein lektin pada kacang kedelai banyak terdapat pada bagian kotiledon. Pada pra penelitian telah dilakukan isolasi fragmen dari bagian kulit bijinya. Hasil penelitian tersebut menjadi acuan dalam penelitian ini untuk melakukan isolasi fragmen gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*, amplifikasi dengan teknik PCR dan sekuensing untuk mengetahui urutan nukleotida gen lektinnya serta mengetahui homolog dari gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, masalah yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana urutan sekuens nukleotida fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*?
2. Berapakah persentase homolog susunan nukleotida fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* terhadap data gen lektin pada NCBI?



### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan gen lektin dan urutan sekuens basa nukleotida, serta persentase homolog susunan nukleotida fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* terhadap data gen lektin pada NCBI.

### **D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai urutan sekuens basa nukleotida fragmen gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk pengaplikasian gen lektin pada penelitian berikutnya.

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERPIKIR

#### A. Kajian Pustaka

##### 1. Kacang kedelai (*Glycine max* (L) Merrill)

Kedelai atau kacang kedelai merupakan tanaman yang dibudidayakan untuk diambil bijinya sebagai bahan pangan. Kedelai jenis liar *Glycine ururiencis*, merupakan kedelai yang menurunkan berbagai kedelai yang di kenal sekarang (*Glycine max* (L) Merrill). Di Indonesia kacang kedelai mulai dibudidayakan pada abad ke-17 sebagai tanaman makanan dan pupuk hijau. Kacang kedelai masuk kedalam bangsa *Fabaceae* (Adie, 2007). Biji kedelai diketahui mengandung protein yang memiliki efek antibakterial seperti aglutinin (lektin *N-acetylgalactosamine* spesifik) (Bhol, 2012). Gambar morfologi dari kacang kedelai terlihat pada Gambar 1.

Kacang kedelai memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: Glycine
Spesies	: <i>Glycine max</i> (L.) Merrill. (Rukmana,1996)



**Gambar 1.** Tanaman Kacang Kedelai (*Glycine Max* (L) Merrill (BALITKABI, 2008)

## **2. Morfologi biji kacang kedelai**

Tanaman kedelai umumnya tumbuh tegak, berbentuk semak, dan merupakan tanaman semusim (annual). Morfologi tanaman kedelai didukung oleh komponen utamanya, yaitu akar, daun, batang, polong, dan biji sehingga pertumbuhannya bisa optimal (Irwan, 2006).

Biji merupakan suatu struktur kompleks, yang terdiri dari embrio atau lembaga, kulit biji dan endosperma (Hidayat, 1985). Biji dibentuk dengan adanya perkembangan bakal biji. Pada saat pembuahan, serbuk sari memasuki kantung embrio melalui mikrofil dan menempatkan dua buah inti gamet jantan pada kantung embrio. Satu diantaranya bersatu dengan inti sel telur dan yang lain bersatu dengan dua inti polar yaitu inti sekunder. Penyatuan gamet jantan dengan sel telur menghasilkan zigot yang tumbuh menjadi embrio. Penyatuan gamet jantan yang lain dengan kedua inti polar menghasilkan inti sel endosperm pertama yang akan membelah-melah menghasilkan jaringan endosperm. Proses yang melibatkan kedua macam pembuahan (penyatuan) tersebut dinamakan pembuahan ganda (Fachruddin, 2000).

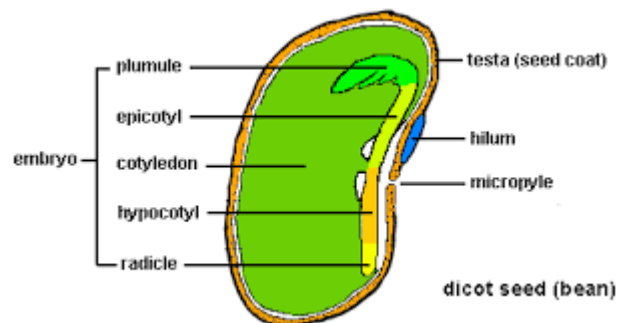
Biji kedelai terbagi menjadi dua bagian utama, yaitu embrio dan kulit biji. Embrio pada tanaman kacang kedelai terbentuk sempurna, dan terdiri dari epikotil (calon pucuk), kaulikulus (calon batang), kotiledon (calon daun) dan radikula (calon akar) (Irwan, 2006). Bentuk biji kacang kedelai hitam terlihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Biji Kacang Kedelai (*Glycine max* (L) Merril) (BALITKABI, 2008)

Kulit biji (*spermodermis*) berasal dari selaput bakal biji (*integumentum*). Bagian-bagian dari biji kacang kedelai dijelaskan pada gambar 3. Kulit biji dari tumbuhan biji tertutup (*Angiospermae*) terdiri atas dua lapisan, (Irwan, 2006) yaitu:

1. Lapisan Kulit Luar (*testa*), keras seperti kayu atau batu. Bagian ini merupakan pelindung utama bagian biji yang di dalam. Lapisan luar ini berwarna coklat pucat.
2. Lapisan Kulit Dalam (*tegmen*), tipis seperti selaput, dinamakan juga kulit ari. Pada pembentukan kulit biji dapat pula ikut serta bagian bakal biji yang lebih dalam daripada integumentumnya, misalnya lain bagian jaringan nuselus yang terluar. Pada Gambar 3 dijelaskan letak dan bentuk struktur biji kacang kedelai.



**Gambar 3.** Struktur Biji Kacang Kedelai (*Glycine max*) (Campbell, 2000)

Biji kedelai tidak mengalami masa dormansi sehingga setelah proses pembijian selesai, biji kedelai dapat langsung ditanam. Namun demikian, biji tersebut harus mempunyai kadar air berkisar 12-13% (Hidayat, 1985).

### 3. Kacang kedelai (*Glycine max* (L) Merril) *Detam 1* dan *Detam 2*

Berdasarkan data Balai Penelitian Kacang-kacangan dan Umbi-umbian (BALITKABI) Malang tahun 2008, *Detam 1* merupakan hasil persilangan antara kedelai galur introduksi 9837 dengan varietas kawi dan memiliki nomor galur 9837/K-D-8-185 (Adie, 2007). *Detam 1* memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 45,40% dari berat kering dan kandungan lemak 13,10% dari berat kering. *Detam 1* merupakan kacang kedelai yang memiliki ukuran biji besar, berat 100 biji 14,84 gram. Biasanya *Detam 1* ini digunakan sebagai bahan utama pembuatan kecap (BALITKABI, 2008).

*Detam 2* merupakan hasil persilangan F8 antara kedelai galur introduksi 9837 dengan varietas Wilis, dan memiliki nomor galur 9837/W-D-5-211. *Detam 2* memiliki kandungan protein yang paling tinggi di Indonesia yaitu 45,58% dari berat kering dan kandungan lemak 14,83% dari berat kering. *Detam 2* tergolong toleran kekeringan pada fase reproduktifnya (BALITKABI, 2008).

Berikut merupakan data komposisi dari setiap varietas kacang kedelai yang ada di Indonesia, dijelaskan pada tabel 1.

**Tabel 1.** Deskripsi Biji Beberapa Varietas/Galur Kacang Kedelai Unggul Di Indonesia

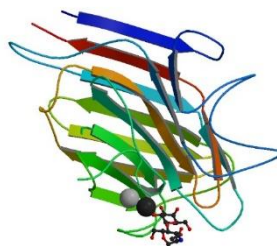
Varietas/ Galur	Warna kulit biji	Bobot 100 biji (gram)	Protein (%bk)	Lemak (%bk)	Potensi hasil (t/ha)	Tahun dilepas
Argomulyo	Kuning	18-19	37-40,20	19,30-20,80	2	1998
Grobogan	Kuning	18	43,90	18,40	3,40	2008
Panderman	Kuning	15-17	36,90	17,70	2,40	2003
Burangrang	Kuning	14,90-17	39-41,60	20	2,50	1999
Bromo	Kuning	14,40-15,80	37,80-42,60	19,50	2,50	1998
Anjasmoro	Kuning	14,80-15,30	41,80-42,10	17,20-18,60	2,30	2001
<i>Detam 1</i>	Hitam	14,80	45,40	13,10	3,50	2008
<i>Detam 2</i>	Hitam	13,50	45,60	14,80	3	2008
Tampomas	Kuning	10,90-11	34-41,20	18-19,60	1,90	1992
Cikuray	Hitam	9,10-11	35-42,40	17-19	1,70	1992
Wilis	Kuning	8,90-11	37-40,50	18-18,80	1,60	1983
Kawi	Kuning	10,10-10,50	38,50-44,10	16,60-17,50	2	1998
Mallika	Hitam	9-10	37	20	2,90	2007
Merapi	Hitam	8-9,50	41-42,60	7,50-13	1	1938
Krakatau	Kuning	8-9,10	36-44,30	16-17	1,90	1992

#### 4. Protein lektin kacang kedelai (*Glycine Max* (L) Merrill)

Kata Lektin berasal dari kata Latin yang berarti “memilih” karena lektin sangat spesifik untuk mengikat situs gugus karbohidrat tertentu. Protein lektin termasuk protein yang berperan dalam sistem imun dan memiliki domain yang dapat berikatan secara reversibel dengan molekul monosakarida atau oligosakarida tanpa merusak struktur kovalen dari gugus karbohidrat tersebut. Gugus karbohidrat yang mampu diikat oleh lektin adalah *D-(+)* galactose, *D-*

(+)-raffinose, L-(+)-arabinose,  $\alpha$ -D-(+) melibiose, dan  $\alpha$ -lactose. Mayoritas lektin merupakan protein non enzim sehingga tidak mempunyai fungsi katalitik (Irwan, 2006). Protein lektin tersebar luas pada tanaman hidup seperti sayuran, buah-buahan dan kacang-kacangan, tetapi pada kacang-kacangan jumlah lektin sangat tinggi (Lis dan Sharon, 1978).

Protein lektin memiliki beberapa sifat yaitu: lektin hanya mengikat pada sakarida spesifik, lektin termasuk dalam *housekeeping-gen* (gen yang berada pada hampir seluruh bagian fungsional sel) (Dodd, 2001). Lektin memiliki dua tempat pengikat sakarida yang memiliki fungsi berbeda yaitu proses aglutinasi (penggumpalan) dan presipitasi (pengikatan) (Peumans, 1995). Pada tanaman, lektin memiliki banyak fungsi yang membantu pertumbuhan tanaman tersebut. Lektin mampu menjadi pertahanan tubuh atau zat antibodi bagi tumbuhan terhadap patogen sekitar seperti jamur, bakteri, virus dan insekta. Struktur gen lektin lihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur Gen Lektin (RCSB PDB, 2016)

Gen lektin pada tanaman kacang kedelai (*Glycine max*) memiliki nama LE-1, SBA, Agglutinin. Dari data NCBI gen lektin memiliki panjang 855 nukleotida dan memiliki berat 30,928 Da. Data origin DNA gen Lektin dari NCBI adalah :

1 atgcatcaca gtgcaattta gctgaagcaa agcaatggct acttcaaagt tgaaaaccca  
61 gaatgtgggt gtatctctct ccctaacctt aaccttgga ctggtgctac tgaccagcaa  
121 ggcaaactca gcggaactg tttcttcag ctggaacaag ttcgtgccga agcaaccaa  
181 catgatcctc caaggagacg ctattgtgac ctctcggga aagtacaac tcaataaggt  
241 tgacgaaaac ggcaccccaa aaccctcgtc tcttggtcgc gccctctact ccaccccat  
301 ccacattgg gacaaagaaa ccggtagcgt tgccagcttc gccgcttct tcaactcac  
361 cttctatgcc cctgacacaa aaaggctgc agatgggctt gccttcttc tcgaccaat  
421 tgactaag ccacaaacac atgcaggta tcttggtctt ttaacgaaa acgagtctgg  
481 tgatcaagtc gtcgctgtg agttgacac ttccggaac tctgggatc caccaaacc  
541 acacatcggg attaactgca attctatcag atccatcaaa acgacgtctt gggattggc  
601 caacaataaa gtagccaagg ttctcattac ctatgatgcc tccaccagcc tctgggtgc  
661 ttcttggtc taccctcac agagaaccag caatacctc tccgatgtgg tcgattgaa  
721 gacttctct cccgagtggg tgaggatagg gttctctgct gccacgggac tcgacatacc  
781 tggggaatcg catgacgtgc tttcttggtc tttgcttcc aattgccac acgctagcag  
841 taacattgat ctttggtc ttacaagctt tgtgtgcat gaggccatct aatgtgaca  
901 gatcgaagga agaaagtga ataagacgac tctcactact cgatcgctag tgattgcat  
961 tgttatatat aataatgta tcttcacaa cttatcgtaa tgcatgtgaa actataaac  
1021 attaa

Dari data origin di atas, jika ditranslasikan menjadi protein maka memiliki 285 asam amino. ( lihat gambar 5).



10	20	30	40	50
MATSKLKTQN	VVVSLSLTLT	LVLVLLTSKA	NSAETVSFSW	NKFVPKQPNM
60	70	80	90	100
ILQGDIVTS	SGKLQLNKVD	ENGTPKPSSL	GRALYSTPIH	IWDKETGSVA
110	120	130	140	150
SFAASFNFTF	YAPDTKRLAD	GLAFFLAPID	TKPQTHAGYL	GLFNENESGD
160	170	180	190	200
QVVAVEFDTF	RNSWDPPNPH	IGINVNSIRS	IKTTSWDLAN	NKVAKVLITY
210	220	230	240	250
DASTSLLVAS	LVYPSQRTSN	ILSDVVDLKT	SLPEWVRIGF	SAATGLDIPG
260	270	280		
ESHVDVLSWSE	ASNLPHASSN	IDPLDLTSFV	LHEAI	

**Gambar 5.** Urutan Asam amino Lektin ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

## 5. Desain primer

Primer adalah suatu oligonukleotida (biasanya 16 hingga 30 nukleotida) yang dapat digunakan untuk mengawali amplifikasi sekuen DNA. Fungsi Primer adalah menyediakan ujung 3'-OH yang akan digunakan untuk menempelkan molekul DNA pertama dalam proses polimerisasi. Primer biasanya merupakan sepasang oligonukleotida, antara 15–25 basa yang digunakan untuk mengamplifikasi (memperbanyak) fragmen yang berada diantaranya.

Syarat mendesain primer biasa diantaranya kedua primer hendaknya tidak mengalami *self-annealing* sehingga sekuen sepasang primer tidak saling komplemen, lalu khususnya pada ujung 3', tidak terjadi primer-dimer (primer berikatan dengan primer lainnya yang sejenis), dan kedua primer sebaiknya tidak mempunyai basa nukleotida T pada ujung 3' -nya karena akan menyebabkan *mismatch* (Kolmodin dan Birch, 2002).

Primer-primer PCR dirancang menggunakan program BIOEDIT, GENAMIC EXPRESSION, OLIGOCALCULATOR, dan FAST PCR. Perancangan primer yang baik harus mempertimbangkan beberapa peraturan tertentu, yakni memperlihatkan besarnya ampikon, panjang primer, titik leleh atau  $T_m$ , dan tidak membentuk struktur sekunder seperti *self-dimer*, *cross dimer* (primer berikatan dengan primer pasangannya (*reverse* dan *forward*)) (Tengel *et al.*, 2001).

## 6. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat *in vitro* yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas. Dalam waktu sembilan tahun sejak pertama kali dikemukakan oleh ilmuan dari *Cetus Corporation*, PCR telah berkembang menjadi teknik utama dalam laboratorium biologi molekuler (Putra, 1999).

PCR digunakan untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam satu *thermocycle* (Muladno, 2010).

### a. **Komponen PCR**

Beberapa komponen penting yang dibutuhkan dalam reaksi PCR adalah DNA *template*, sepasang primer oligonukleotida, DNA *polymerase*, deoksinukleosida trifosfat (dNTP) dan larutan *buffer* (Muladno, 2010; Gaffar, 2007; Sulistyaningsih, 2007):

### 1) DNA *template*

DNA *template* adalah molekul DNA untai ganda yang mengandung sekuen target yang akan diamplifikasi. Ukuran DNA bukan merupakan faktor utama keberhasilan PCR, berapapun panjangnya jika tidak mengandung sekuen yang diinginkan maka tidak akan berhasil proses suatu PCR, namun sebaliknya jika ukuran DNA tidak terlalu panjang tapi mengandung sekuen yang diinginkan maka PCR akan berhasil.

### 2) Primer

Susunan primer merupakan salah satu kunci keberhasilan PCR. Pasangan primer terdiri dari 2 oligonukleotida yang mengandung 18-28 nukleotida dan mempunyai 40-60% GC *content*. Ujung 3' primer menentukan spesifitas dan sensitivitas PCR, disamping itu tidak boleh komplementer satu dengan yang lain karena hal ini mengakibatkan primer-dimer yang akan menurunkan hasil produk yang diinginkan. Ujung 5' primer tidak terlalu penting untuk *annealing* primer.

Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan *mispriming* (penempelan pada tempat yang tidak spesifik) dan akumulasi produk non spesifik serta meningkatkan kemungkinan terbentuk primer-dimer, tetapi apabila konsentrasinya rendah maka PCR menjadi tidak efisien sehingga hasilnya rendah.

### 3) DNA *polymerase*

DNA *polymerase* adalah enzim yang mengkatalisis polimerisasi DNA. Kini banyak digunakan enzim *Taq DNA polymerase* yang memiliki keaktifan

pada suhu tinggi sehingga penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklus dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Gaffar, 2007).

Enzim *Taq polymerase* berasal dari isolat sel bakteri *Thermus aquaticus* dan enzim rekombinan yang disintesis didalam sel bakteri *Escherichia coli* (Muladno, 2010). Konsentrasi enzim yang dibutuhkan untuk PCR apabila berlebihan mengakibatkan akumulasi produk non spesifik, sedangkan jika terlalu rendah maka dihasilkan sedikit produk yang diinginkan (Sulistyaningsih, 2007).

#### 4) *Deoxynucleotide Triphosphate* (dNTP)

*Deoxynucleotide Triphosphate* merupakan material utama untuk sintesis dalam proses PCR yang terdiri dari dATP, dGTP, dan dTTP. Konsentrasi dNTP masing-masing sebesar 20-200 $\mu$ M. *Deoxynucleotide Triphosphate* akan menurunkan  $Mg^{2+}$  bebas sehingga mempengaruhi aktivitas polimerase dan menurunkan *annealing* primer. Konsentrasi dNTP yang rendah akan meminimalkan *mispriming* pada daerah non target dan menurunkan kemungkinan perpanjangan nukleotida yang salah. Oleh karena itu spesifitas dan ketepatan PCR meningkat pada konsentrasi dNTP yang lebih rendah (Sulistyaningsih, 2007).

#### 5) Larutan *buffer*

Larutan *buffer* yang biasa digunakan untuk reaksi PCR mengandung 10 mM TrisHCl pH 8,3, 50 mM KCl, dan 1,5 mM  $MgCl_2$  (Sulistyaningsih, 2007).

## 6) Kofaktor Ion Metal

Magnesium Klorida ( $MgCl_2$ ) merupakan kofaktor esensial untuk DNA *polymerase* yang digunakan di dalam PCR dan konsentrasinya harus dioptimasi untuk setiap sistem primer *template*. Konsentrasi ion ini mempengaruhi beberapa hal yaitu *annealing* primer, suhu pemisahan untai *template* dan produk PCR, spesifitas produk, pembentukan primer-dimer serta aktivitas dan ketepatan enzim *Taq polymerase* (Kolmodin dan Birch, 2002).

### b. Tahapan PCR

Proses PCR memiliki beberapa tahapan, seperti berikut:

#### 1) Denaturasi

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. 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 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°C; 95°C dan 97,5°C (Muladno, 2010).

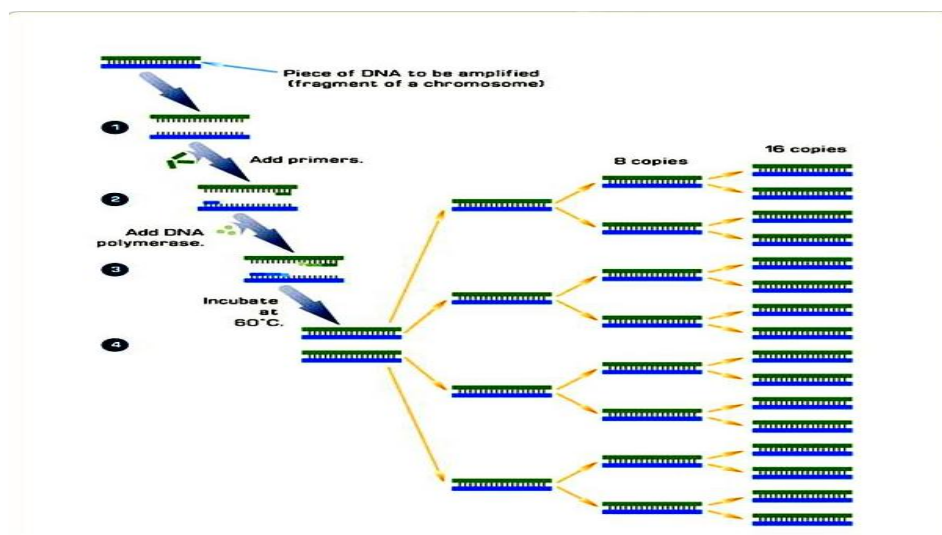
#### 2) Penempelan (*Annealing*)

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing*

ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen template. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu 50-60°C (Gaffar, 2007).

### 3) Pemanjangan (*Extention*)

Selama tahap ini enzim *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 (Yuwono, 2009). Tahapan PCR dijelaskan pada gambar 6.



Gambar 6. Tahapan PCR (Yusuf, 2010)

## **B. Kerangka Berpikir**

Kacang kedelai termasuk komoditas pangan yang penting setelah beras dan jagung. Kacang kedelai tidak mengalami masa dormansi sehingga dapat langsung ditanam, untuk komoditas pangan biji kedelai disimpan. Masa penyimpanan ini rentan terhadap patogen seperti jamur, bakteri. Kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* merupakan kacang kedelai yang memiliki kandungan protein yang tinggi dan biasa digunakan sebagai bahan produk pangan. Berdasarkan data BALITKABI dijelaskan bahwa kedua varietas kacang kedelai ini mampu tahan terhadap kekeringan dan menghasilkan produksi biji yang besar, oleh karena itu, penelitian ini terfokus pada satu protein yaitu protein lektin yang mampu bekerja sebagai zat antimikroba karena protein tersebut dapat mengikat gugus karbohidrat seperti monosakarida atau oligosakarida yang terdapat pada dinding sel patogen. Peranan protein lektin dapat dianggap penting untuk mencegah pembusukkan biji oleh patogen. Penelitian ini merupakan penelitian awal mengenai isolasi dan analisis sekuens nukleotida gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* di Indonesia.

Penelitian ini ingin mengetahui urutan sekuens fragmen gen lektin yang terdapat pada biji kacang kedelai, serta persentase homolog susunan nukleotida fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Tujuan Operasional Penelitian**

1. Melakukan teknik isolasi fragmen gen lektin pada biji tanaman kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.
2. Melakukan desain primer untuk mendapatkan fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.
3. Melakukan teknik PCR untuk amplifikasi fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.
4. Membaca urutan sekuens hasil PCR fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.
5. Melakukan analisis homolog gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

#### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan bulan Oktober 2015 di Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

#### **C. Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Data berupa foto hasil PCR fragmen gen lektin yang telah dilakukan



elektroforesis, hasil sekuensing urutan nukleotida fragmen gen lektin dari masing-masing varietas dalam bentuk chromatogram dan gambar homolog gen lektin antara kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

#### **D. Prosedur Penelitian**

##### **1. Alat dan Bahan**

###### **a. Isolasi DNA Biji Kacang Kedelai**

Alat-alat yang digunakan untuk mengisolasi DNA adalah sentrifugasi, *water bath*, mikro pipet berserta tip steril ukuran 0,1-10  $\mu\text{L}$ ; 10-100  $\mu\text{L}$ ; dan 100-1000  $\mu\text{L}$ . Sedangkan bahan-bahan yang digunakan berupa biji kacang kedelai, aquabidestilata steril, isopropanol, dan etanol 75%, larutan SDS, enzim proteinase K, DNA *Lysis cell*, Larutan STE ph 7,4, kloroform, serta larutan serta *Tri Reagen Solution Kit*.

###### **b. Deteksi DNA Genom Biji Kacang Kedelai**

Deteksi DNA menggunakan spektrofotometri bertujuan untuk mengetahui indeks kemurnian DNA dengan panjang gelombang tertentu. Alat-alat yang digunakan pada metode deteksi DNA ini menggunakan mesin Nanodrop (*Maestro Gen*), mikro pipet (*BioRad*) beserta tip (*Biologix*) steril ukuran 0,5-10  $\mu\text{L}$ , dan sarung tangan karet. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan berupa DNA genom sampel, dan blanko (*DNA Rehydration solution*).

### **c. Amplifikasi Gen Lektin dengan Metode PCR**

Amplifikasi fragmen DNA lektin dapat dilakukan dengan teknik PCR. Alat yang digunakan untuk proses amplifikasi ini berupa *Techne* TC-3000G, *Vortex (Thermolyne)* mikro sentrifugasi (*Revolutionary Science*), Mikro pipet (Socorex) beserta tip steril ukuran 0,1-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , tabung mikro beserta rak tabung mikro ukuran 1,5 ml, tabung PCR ukuran 0,5 ml, Kotak berisi es, dan lemari pendingin.

Bahan yang digunakan adalah DNA genom sampel, Kit PCR KAPPA *Taq Ready Mix* (terdiri atas: 50 unit/ml Taq DNA polymerase, KAPPA Taq Buffer, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2mM dNTPs dan Dye), aquabidestilata, *dry ice*. Pada pra penelitian telah dilakukan pembuatan desain primer untuk gen lektin. Primer yang digunakan yaitu primer reverse (Leic): (5' CCG GAA AGT GTC AAA CTC AAC AG CG 3'), Primer Forward (Leic): (5' GCG GAA ACT GTT TCT TTC AGC TGG 3').

## **2. Cara Kerja**

### **a. Pengambilan Sampel Biji Kacang Kedelai**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*, merupakan hasil persilangan *back cross* F8. Dengan demikian tingkat keragaman genom yang dihasilkan sudah sangat rendah (mendekati nol) (Adie, 2008). Sampel ini direndam dalam air selama 3 jam kemudian diambil *whole* bijinya.

## **b. Isolasi DNA Genom Biji Kacang Kedelai**

Pada pra penelitian telah dilakukan isolasi DNA kulit biji (testa) kacang kedelai konsumsi dengan menggunakan teknik isolasi terbaru yaitu Teknik Isolasi RIDE (Puspitaningrum *et al.*, 2015), dengan langkah kerja sebagai berikut:

- 1) Biji kacang kedelai direndam dengan air selama 3 jam, lalu diambil bagian *whole* bijinya dan timbang sebesar 0,3 gram.
- 2) Selanjutnya, lumpang dan alu disiapkan dan biji dihaluskan dengan cara ditumbuk, setelah halus dimasukkan kedalam tabung mikro 1,5 ml.
- 3) DNA *lysis cell* 1000  $\mu$ L, Proteinase K 70  $\mu$ L, larutan SDS 20% 80  $\mu$ L dimasukkan kedalam tabung mikro dan diinkubasi selama 4 jam.
- 4) Larutan STE ph 7,4 sebanyak 600  $\mu$ L dimasukkan ke dalam tabung mikro, akan terbentuk bagian pelet dan supernatan.
- 5) Sebanyak 500  $\mu$ L supernatan dipindahkan ke tabung mikro baru, lalu dimasukkan 1 ml *Tripure*.
- 6) Sampel diinkubasi selama 5 menit dengan suhu ruang (sambil dibolak-balik hingga homogen), selanjutnya disentrifuse sebesar 10.000 rpm selama 12 menit.
- 7) Terbentuklah supernatan dan pelet, yang diambil adalah supernatannya.
- 8) Supernatan dimasukkan ke dalam *Tripure*, dan ditambahkan dengan 100  $\mu$ L kloroform dingin, dilanjutkan dengan diinkubasi selama 8 menit, disentrifuse 10.000 rpm selama 13 menit.

- 9) Supernatan diambil, dipindahkan ke tabung mikro dan ditambahkan isopropanol sebanyak 500  $\mu\text{L}$ .
- 10) Langkah selanjutnya, sampel divortex, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 5-10 menit dan disentrifuse 10.000 rpm selama 10 menit.
- 11) Supernatan dibuang setelah dilakukan *vortex*, lalu 1000  $\mu\text{L}$  etanol 75% dingin ditambahkan kedalam tabung mikro, dan disentrifuse 7500 rpm selama 5 menit.
- 12) Buang supernatan, lalu divakum sampai kering dan ditambahkan buffer *Rehydrasi Solution* sebanyak 50  $\mu\text{L}$ .

### **c. Deteksi DNA Genom Biji Kacang Kedelai dengan Spektrofotometri**

Spektrofotometri dimulai dengan memilih menu *measure blank*. Kemudian 2  $\mu\text{L}$  blanko (*DNA Dehydration*) dipipetkan pada plat uji secara perlahan, lalu plat uji ditutup dan tombol *blank* ditekan, setelah itu plat uji dibersihkan menggunakan *tissue* steril. Langkah selanjutnya pada program terdapat menu *sample* lalu ditekan. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  DNA hasil isolasi dipipetkan pada plat uji, kemudian plat uji ditutup lalu menu *enter* ditekan. Setelah itu, hasil pembacaan serapan akan keluar pada layar. Hasil berupa nilai serapan pada panjang gelombang 230nm, 260nm, dan 280nm, serta indeks kemurnian DNA dan konsentrasi DNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Kemudian hasil pengujian didokumentasikan.

#### **d. Desain Primer Gen Lektin**

Berikut merupakan langkah-langkah mendesain primer:

- 1) Menentukan posisi gen yang diinginkan dalam genom *makhluk hidup*.
- 2) Menentukan posisi *forward primer* dan *reverse primer* dengan *Genamics Expression*. Posisi primer diupayakan berdekatan dengan *start* dan *stop* kodon serta mengarah ke situs pemotongan enzim restriksi.
- 3) Jika situs pemotongan enzim restriksi di dekat *start* dan *stop* kodon sulit disesuaikan dengan posisi primer, dapat dilakukan mutasi situs pemotongan pada 2-3 nukleotida. Mutasi 2-3 nukleotida pada sekuen gen selulase tidak akan mengurangi daya lekat primer terhadap untai DNA asalkan presentase Guanin (G) dan Sitosin (C) primer cukup tinggi.
- 4) Mengecek desain primer dengan aplikasi *geneious* untuk mengetahui tingkat spesifitas primer dan ukuran produk PCRnya.

Pada pra penelitian telah dilakukan desain primer gen lektin pada kacang kedelai (*Glycine max*) pada gugus lektin dan glycosilasi dengan berat molekul 387 pb terlampir pada lampiran 1 (Puspitaningrum *et al.*, 2015).

#### **e. Amplifikasi Gen Lektin dengan metode PCR**

Pada pra penelitian, telah dilakukan pembuatan desain primer yang diberi nama primer LEIC. Primer tersebut digunakan untuk deteksi gen lektin pada kacang kedelai, Primer yang digunakan yaitu primer reverse

(Leic): (5' ccg gaa agt gtc aaa ctc aac ag cg 3'), Primer forward (Leic): (5' gcg gaa act gtt tct ttc agc tgg 3') dengan hasil produk PCR sebesar 387 pb. Proses PCR, diawali dengan pembuatan mix PCR (*Cocktail* PCR). Pembuatan mix PCR diawali dengan mengukur konsentrasi DNA genom sampel dengan *Nanodrop*, Komposisi mix PCR (untuk satu kali resep/tabung PCR) ditunjukkan pada tabel 2.

**Tabel 2. Pembuatan Mix PCR**

<b>MIX PCR</b>		
<b>Kontent</b>	<b>Volume</b>	<b>Konsentrasi</b>
<b><i>Template</i> DNA</b>	.... $\mu\text{L}$	100ng/ $\mu\text{L}$
<b>Primer F</b>	1 $\mu\text{L}$	10pmol
<b>Primer R</b>	1 $\mu\text{L}$	10pmol
<b>KAPA Taq</b>	12,5 $\mu\text{L}$	
<b>Aqubides</b>	8,5 $\mu\text{L}$	
<b>Total</b>	25 $\mu\text{L}$	

Setelah Mix PCR dibuat, kemudian tabung tersebut dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler*. Program PCR untuk amplifikasi gen lektin dijalankan sesuai program pada tabel 3.

**Tabel 3. Program *Running* PCR**

Tahap	PROGRAM PCR		
	Suhu	Waktu	Siklus
<b>Denaturasi awal</b>	94°C	3'	1
<b>Denaturasi</b>	94°C	30"	40
<b>Annealing</b>	60,1°C	30"	40
<b>Elongasi</b>	72°C	45'	40
<b>Elongasi akhir</b>	72°C	10'	1
<b>Simpan</b>	4°C	∞	1

**f. Deteksi Produk PCR Menggunakan Elektroforesis Gel Agarosa 2 %**

Langkah awal yang dilakukan adalah membuat gel agarosa 2 % dengan cara mencampurkan 0,8 gram agarosa dalam 40 mL buffer TAE 1x (10 mL Larutan tris 0,5 M; 1,36 gram Na Asetat.3H<sub>2</sub>O; 0,37224 gram EDTA; 250 mL akuabidestilata). Pada gel ditambahkan 1 µL etidium bromida untuk memfasilitasi visualisasi DNA setelah proses elektroforesis selesai. Elektroforesis dilakukan dengan beda potensial 100 volt selama 30 menit dalam buffer TAE. Pita DNA divisualisasi dengan menempatkan gel di bawah UV transiluminator pada *Gel Doc System*. Denah penempatan sampel dalam sumur elektroforesis dijelaskan pada gambar 7.

DNA Marker	Sampel <i>Detam 1</i>	Sampel <i>Detam 2</i>
------------	-----------------------	-----------------------

**Gambar 7.** Denah Penempatan Sampel dan DNA Marker pada Elektroforesis

Apabila didapatkan pita yang diinginkan pada hasil elektroforesis sepanjang 387pb, maka langkah selanjutnya yaitu sekuensing hasil PCR

tersebut untuk mendapatkan urutan nukleotida. Sekuensing hasil PCR menggunakan jasa sekuensing PT *Macrogen, Singapore*.

#### **E. Teknik Analisa Data**

Hasil sekuensing berupa urutan nukleotida fragmen gen lektin dianalisis dengan perangkat lunak *Chromas Pro*. Hasil sekuensing diedit dan disejajarkan menggunakan perangkat lunak MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) 5 dan BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) NCBI untuk memperoleh kesamaan antar varietas kacang kedelai.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. DNA Genom Biji Kacang Kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*

Berdasarkan hasil isolasi DNA genom biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* dengan Metode RIDE, didapatkan hasil Indeks kemurnian  $\geq 1,75$  dan memiliki konsentrasi yang besar ( $>100\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Biji kacang kedelai *Detam 2* memiliki konsentrasi DNA tertinggi, sebesar  $826,72\text{ ng}/\mu\text{L}$ , sedangkan biji kacang kedelai *Detam 1* memiliki konsentrasi DNA sebesar  $162,01\text{ng}/\mu\text{L}$  (Tabel 4).

**Tabel 4.** Hasil Serapan Absorbansi Spektrofotometer *Maestro Nanodrop* dan Konsentrasi DNA Genom Lektin Sepanjang 387pb.

Sampel	A230 (nm)	A260 (nm)	A280 (nm)	A260/A230 (nm)	A260/A 280 (nm)	[DNA] (ng/ $\mu\text{l}$ )
Kacang Kedelai <i>Detam 1</i>	3,391	3,240	1,439	0,955	2,252	162,01
Kacang Kedelai <i>Detam 2</i>	13,220	16,534	8,967	1,251	1,844	826,72

Prinsip dasar isolasi DNA adalah memisahkan DNA di dalam sel dari zat-zat lain selain DNA, seperti protein histon, polisakarida, dan lain-lain. Metode isolasi DNA dilakukan dengan teknik isolasi terbaru, yaitu teknik RIDE. Metode RIDE digunakan karena pada saat pra penelitian berhasil mendapatkan DNA pada testa kacang kedelai konsumsi (Puspitaningrum *et al.*, 2015).

Sampel biji direndam selama 3 jam sebelum diisolasi. Proses perendaman dilakukan agar terjadi imbibisi air untuk memudahkan pengambilan bijinya tanpa kulit. Imbibisi air adalah peristiwa migrasi molekul-molekul air ke suatu zat lain

yang mempunyai pori-pori cukup besar sehingga mampu melewati molekul air, kemudian molekul air tersebut menetap di dalam zat tersebut. Menurut Irfatongga (2009), lamanya perendaman biji dilakukan karena semakin lama biji direndam, maka semakin besar masuknya air ke dalam endosperma biji. Perendaman biji dalam air mengakibatkan kulit biji lembab dan lebih lunak memungkinkan pecah dan rusak. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Uruc (2008) yang melakukan perendaman biji selama 3 jam.

Penghancuran jaringan dilakukan secara mekanik dengan menggunakan mortar. Penghancuran jaringan secara mekanik dapat menghasilkan partikel-partikel yang dihasilkan lebih halus, dan tidak merusak DNA yang terkandung dalam jaringan tersebut. Menurut Surzycki (2003), penggerusan sampel secara mekanik lebih mudah dan resiko kerusakan DNA lebih kecil.

Isolasi DNA genom biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* diawali dengan menginkubasi sampel yang sudah dihaluskan dan dilarutkan dengan DNA lysis cell, SDS 20%, dan proteinase K. DNA lysis cell berfungsi untuk memecah membran sel (Clark, 1997). Larutan SDS (*Sodium Dodecyl Solution*) 20% merupakan detergen anionik yang mampu mendegradasi membran sel (Sharpe, 2005). Penambahan proteinase-K bertujuan untuk mendegradasi protein. Proteinase K adalah sebuah enzim proteinase yang diekstrak dari *Tritirachium album*. Proteinase-K merupakan enzim yang dapat mengubah protein menjadi peptida dan dapat menjadi agen pelindung dalam ekstraksi DNA. (Cabral *et al.*, 2000).

Isolat DNA genom diukur indeks kemurnian DNA-nya dengan menggunakan alat *Maestro Nanodrop*. Alat tersebut berfungsi untuk mengukur absorbansi dari protein, RNA dan DNA. Nilai absorbansi yang menunjukkan indeks kemurnian DNA adalah  $A_{260}/A_{280}$ . Dell'Anno *et al.*, (1998) menyatakan bahwa apabila hasil absorbansi yang dihasilkan lebih besar sama dengan 1,8, artinya hasil isolasi sampel yang dilakukan murni mengandung DNA, apabila hasil absorbansi lebih besar dari 2,0 hasil isolasi sampel yang dilakukan mengandung DNA dan masih terdapat sedikit RNA. Namun jika hasil absorbansi kurang dari 1,8 hasil isolasi yang dilakukan masih terkandung protein yang cukup banyak, dan perlu dilakukan isolasi ulang (Chen *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil absorbansi yang dihasilkan berupa indeks kemurnian DNA dengan menggunakan *Maestro Nanodrop*, didapatkan nilai indeks kemurnian pada sampel biji kacang kedelai *Detam 1* sebesar 2,252 nm dan *Detam 2* sebesar 1,844 nm. Isolat DNA *Detam 1* mengandung DNA namun masih ada kontaminasi dari RNA, sedangkan isolat *Detam 2* sudah murni mengandung DNANYA saja.

Perbedaan kemurnian DNA dari kedua sampel ini disebabkan karena pada tahap lisis DNA tidak menggunakan RNase, sehingga sampel yang dimiliki masih terdapat campuran RNA-nya. Larutan RNase berfungsi untuk mendegradasikan RNA pada sampel.

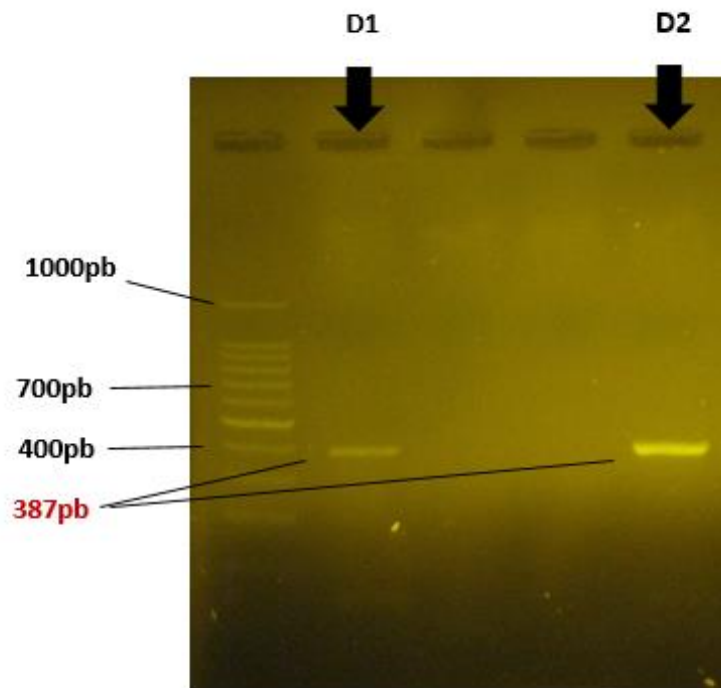
## B. Deteksi Fragmen Gen Lektin Sepanjang 387pb Pada Biji Tanaman Kacang Kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*

Biji kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* yang sudah diisolasi, selanjutnya dideteksi fragmen gen lektin sepanjang 387pb. Amplifikasi fragmen gen lektin biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387pb, berhasil dilakukan pada pra penelitian dengan program yang sudah dilakukan optimasi PCR. Visualisasi fragmen gen lektin hasil PCR dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis agarosa 2%. Hasil fragmen gen lektin diperoleh dengan melakukan optimasi program PCR dan komposisi mix PCR. Program PCR secara optimal mengamplifikasi fragmen gen lektin dijelaskan pada Tabel 3, sedangkan komposisi mix PCR yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Komposisi Mix PCR

MIX PCR		
Kontent	Volume	Konsentrasi
<i>Template DNA Lektin</i>	2 $\mu$ L	200ng/ $\mu$ L
<b>Primer F</b>	1 $\mu$ L	10pmol
<b>Primer R</b>	1 $\mu$ L	10pmol
<b>KAPPA Taq</b>	12,5 $\mu$ L	
<b>Aquabides</b>	8,5 $\mu$ L	
<b>Total</b>	25 $\mu$ L	

Hasil amplifikasi didapatkan secara optimal karena menghasilkan pita yang cukup tebal. Pita positif sampel fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387pb, menggunakan primer Leic *forward* (5' GCG GAA ACT GTT TCT TTC AGC TGG 3'). dan primer Leic *reverse* (5' CCG GAA AGT GTC AAA CTC AAC AG CG 3') (Gambar 8)



**Gambar 8.** Pita Positif pada Sampel Sepanjang 387pb pada Elektroforesis Agarosa 2 % (kolom 1: *marker DNA (Kappa Universal Leader 100pb)*, kolom 2: kacang kedelai *Detam 1 (++)*, kolom 5: kacang kedelai *Detam 2 (+++)*)

**Keterangan :** ++ (Terang)  
+++ (Sangat Terang)

Hasil deteksi fragmen gen lektin dilakukan dengan metode teknik PCR dengan susunan program seperti yang dijabarkan pada Tabel 3. Visualisasi fragmen gen lektin hasil PCR dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis agarosa 2%.

Konsentrasi gel agarosa menentukan kecepatan migrasi molekul DNA (Lu & Morimoto, 2009). Deteksi fragmen DNA hasil PCR menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 2 %. Menurut Lewis (2011) menyatakan bahwa bahwa konsentrasi gel agarosa berkisar 0,7 % untuk DNA dengan ukuran 5-10 kb dan 2 % untuk fragmen DNA 0,2-1 kb. Pita DNA produk PCR dapat dideteksi secara

visual menggunakan primer *reverse* dan primer *forward* dan pengaturan atau optimasi suhu *annealing*.

Program *Primer-Blast* pada situs NCBI dalam penelitian ini dapat digunakan untuk merancang primer yang dapat memotong area kodon ke-33 pada gen lektin. Syarat utama yang perlu diperhatikan dalam merancang primer adalah kespesifikan primer. Menurut Untergasser *et al* (2012) primer hanya dapat menempel dan memotong pada area target yang telah ditentukan dan tidak dapat menempel pada area lain. Hasil rancangan primer yang diperoleh pada penelitian ini adalah primer leic *forward* dan primer leic *reverse* yang masing-masing memiliki 24 basa nukleotida dan 25 basa nukleotida. Panjang primer tersebut dapat meningkatkan kespesifikan primer dan meminimalkan kemungkinan terjadinya penempelan primer pada situs lain (Elsalam, 2003).

Jumlah basa nukleotida G dan C pada primer leic *forward* dan primer leic *reverse* adalah 50% dan 52%. Jumlah basa nukleotida G dan C pada primer tersebut sudah memenuhi syarat primer yang baik. Jumlah basa G dan C pada primer berkisar 40% sampai 60%, untuk menjaga agar suhu *melting* primer tidak berada di bawah 50<sup>0</sup> Celcius (Aird *et al.*, 2011).

Produk PCR yang dihasilkan dari pemotongan primer leic *forward* dan primer leic *reverse* adalah sepanjang 387pb. Hal tersebut sesuai dengan teori yang dikemukakan Olsen (2008) bahwa area hasil pemotongan primer *forward* dan primer *reverse* berkisar antara 300-2.000pb.

Optimasi teknik PCR merupakan langkah yang dilakukan untuk mendapatkan kondisi dan reaksi yang optimal pada proses PCR sehingga diperoleh produk PCR yang optimal (Bartlett *and* Stirling, 2003). Optimasi PCR terhadap program PCR pada penelitian ini dilakukan dengan cara memvariasikan suhu fase penempelan (*annealing*) primer pada DNA *template* dengan menggunakan PCR gradien dengan suhu 58°C pada gradient 6°C. Skema optimasi program PCR gradien dijelaskan pada gambar 9.

Kolom A	Kolom B	Kolom C	Kolom D	Kolom E	Kolom F	Kolom G	Kolom H
55,1°C	55,5°C	56,3°C	57,3°C	58,3°C	59,3°C	<b>60,1°C</b>	60,6°C
-	-	-	-	-	-	<b>+</b>	-

**Gambar 9.** Skema Optimasi Suhu *Annealing* Program PCR Gradien

Berdasarkan variasi suhu yang didapat dari program PCR gradien, penentuan suhu fase penempelan (*annealing*) primer leic *forward* dan leic *reverse* pada DNA *template* berpatokan pada suhu leleh (*melting*) primer. Menurut Olsen (2008), suhu *annealing* diperoleh dari perhitungan suhu didih primer lalu dikurang lima angka. Suhu *annealing* primer leic *forward* dan primer leic *reverse* berada pada kisaran suhu 55-63°C.

Hasil optimasi PCR menunjukkan bahwa suhu fase *annealing* yang optimal adalah pada suhu 60,1° C. Pada suhu tersebut, pita DNA produk PCR yang terbentuk hanya terdapat pada area pemotongan primer yaitu sepanjang 387pb secara spesifik tanpa terbentuknya pita lain. Hal tersebut membuktikan bahwa

proses PCR telah terjadi secara optimal, dimana semua komponen bahan-bahan PCR telah bereaksi secara optimal tanpa menghasilkan bahan sisa reaksi. Waktu fase *annealing* berlangsung selama 30 detik. Penentuan waktu fase *annealing* berdasarkan protokol standar PCR yang disampaikan oleh Bartlett dan Stirling, 2003, bahwa waktu fase *annealing* optimal berada pada rentang waktu 30 detik sampai 1 menit.

Pemrograman PCR pada fase *denaturation* dan fase *extension* diperoleh berdasarkan suhu dan waktu optimal PCR. Fase *denaturation* berlangsung pada suhu 94<sup>0</sup> C selama 2-5 menit dan fase *extension* berlangsung pada suhu 72<sup>0</sup> C selama 1 menit. Penentuan waktu optimal tahap *extension* adalah 1 menit tiap panjang 1 kilo pasangan basa (1.000 *basepair*) dari produk PCR (Bartlett and Stirling, 2003). Jumlah siklus PCR pada penelitian ini untuk mendapatkan hasil optimum, dilakukan sebanyak 40 siklus (Tabel 3). Menurut Bartlett dan Stirling (2003), siklus PCR dapat dilakukan sebanyak 25-40 siklus tergantung dari banyaknya produk yang dapat dihasilkan.

Berdasarkan hasil deteksi fragmen gen lektin (Gambar 8) dibuktikan dengan adanya pita tebal yang cukup terang (++) pada sampel biji kacang kedelai *Detam 1* dan sangat terang (+++) pada kacang kedelai *Detam 2* tepat pada panjang 387pb. Hal ini membuktikan bahwa optimasi yang dilakukan dan primer yang telah didesain berhasil dan sesuai dengan target yang diinginkan.

Perbedaan ketebalan pita yang dihasilkan dipengaruhi oleh konsentrasi fragmen DNA yang dimiliki oleh masing-masing sampel, pada Tabel 4 dijelaskan bahwa

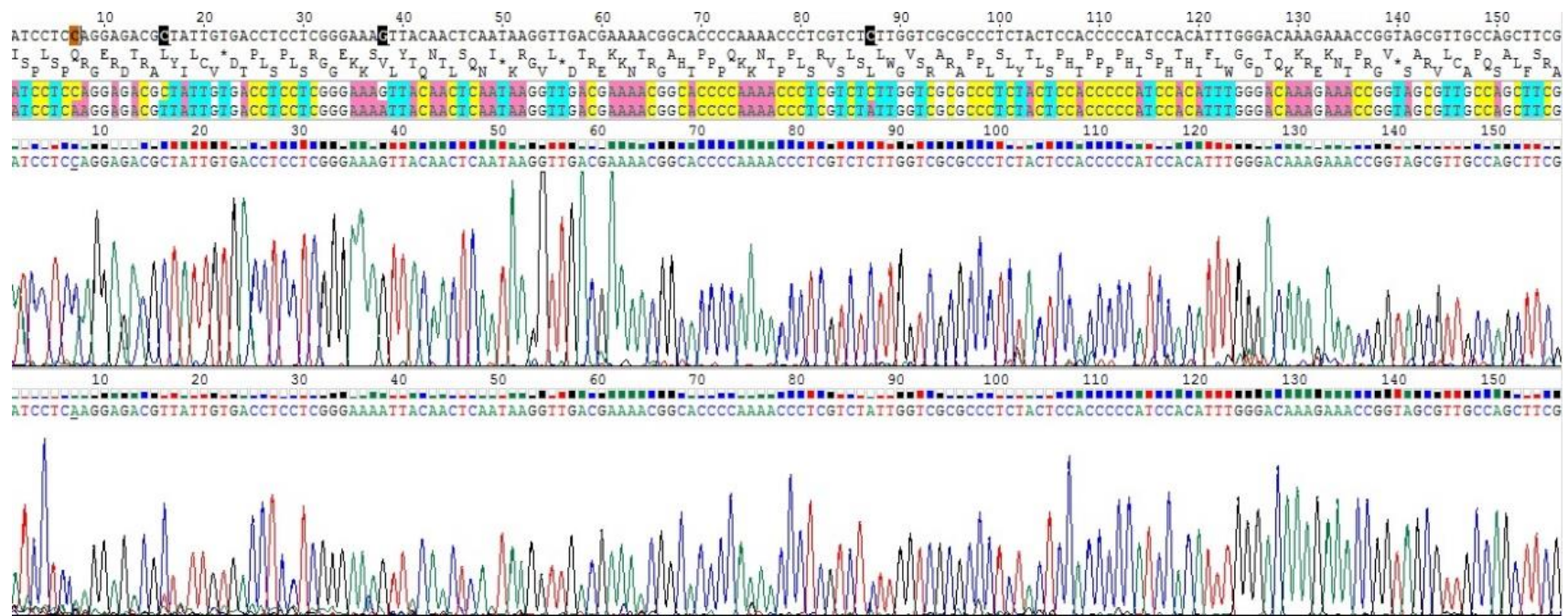


konsentrasi DNA genom biji kacang kedelai *Detam 1* lebih tinggi dibandingkan biji kacang kedelai *Detam 2*. Konsentrasi DNA genom biji kacang kedelai *Detam 1* adalah 162,01 ng/ $\mu$ l sedangkan konsentrasi DNA genom biji kacang kedelai *Detam 2* adalah 826,72 ng/ $\mu$ l.

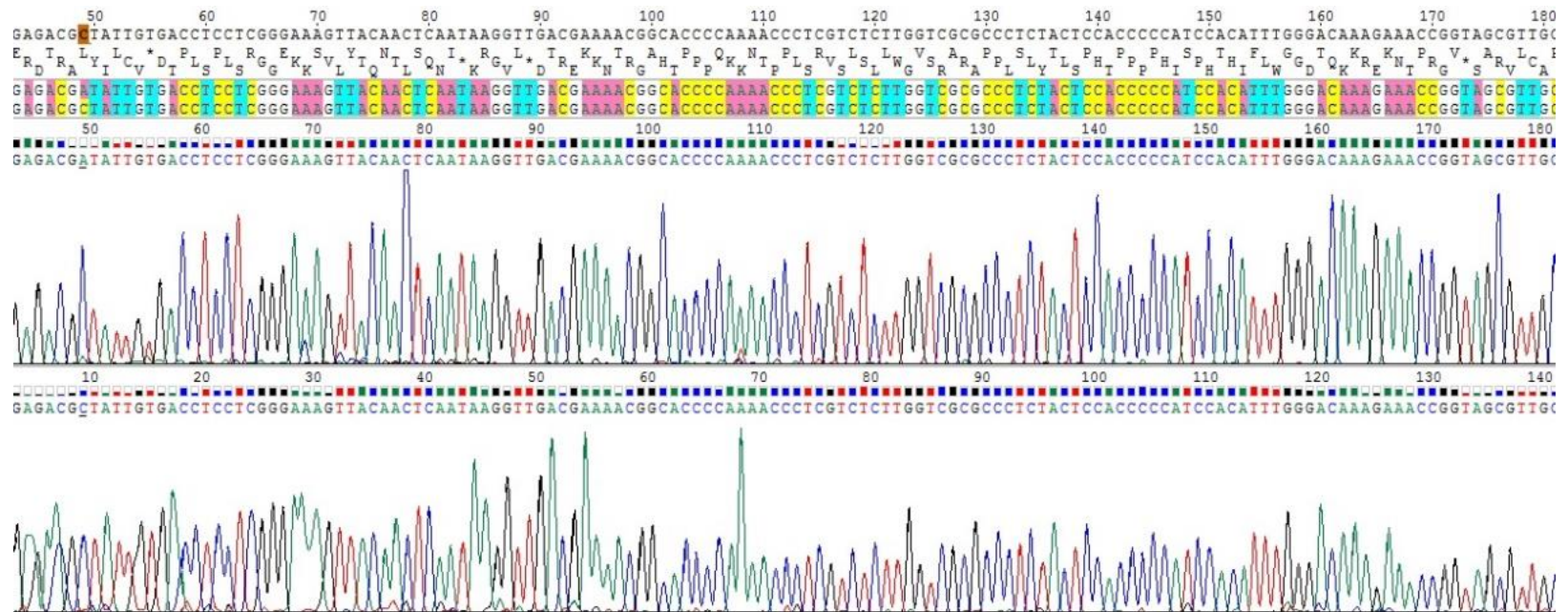
### **C. Sekuens Biji Kacang Kedelai *Detam 1* dan *Detam 2***

#### **1. Sekuens biji kacang kedelai *detam 1* dan *detam 2* dengan aplikasi *chromas pro***

Pengolahan hasil sekuens dilakukan dengan perangkat lunak *Chromas Pro* kemudian menyejajarkan hasil tersebut melalui perangkat lunak *Mega 5* dan NCBI. Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses teknik pembacaan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan nukleotida tersebut merupakan informasi mendasar suatu gen karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Manfaat melakukan sekuensing adalah untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuen-nya dengan sekuen DNA lain yang sudah diketahui (Campbell, 2000).



Gambar 10a. Hasil Kromatogram Fragmen Gen Lektin Biji Kacang Kedelai *Detam 1* Sepanjang 387pb



**Gambar 10b.** Hasil Kromatogram Fragmen Gen Lektin Biji Kacang Kedelai *Detam 2* Sepanjang 387pb

*Template* sekuensing fragmen gen lektin biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* adalah produk PCR gen lektin sepanjang 387pb (lihat gambar 10a dan 10b). Hasil sekuensing berupa grafik kromatogram dengan puncak-puncak yang berwarna-warni untuk membedakan jenis basa nitrogen (nukleotida) yang dicirikannya. Nukleotida A (Adenin) berwarna hijau, nukleotida G (Guanin) berwarna hitam, C (Citosin) nukleotida berwarna biru dan nukleotida T (Timin) berwarna merah. Hal ini sesuai dengan pendapat McPherson (2006) yang menyatakan bahwa pola warna sekuen yang sama juga sesuai dengan hasil penelitian sekuensing nukleotida pada fragmen DNA.

Hasil data sekuensing yang diperoleh dari kedua sampel diedit menggunakan *software* Mega 5 dan Chromas Pro dikontrol secara manual. Berdasarkan lampiran 3, dapat dilihat bahwa kedua puncak yang dihasilkan cukup baik sehingga lambang N yang merupakan lambang untuk simbol A, G, C, dan T yang muncul tidak banyak. Pengeditan dilakukan dengan menentukan lambang nukleotida dengan memperhatikan pola puncak-puncak tertinggi. Jika terjadi keraguan maka penentuan jenis nukleotidanya difokuskan dengan memperkecil terjadinya variasi jenis nukleotidanya atau nukleotida yang mengalami pembacaan ganda pada urutan tersebut dipotong dari urutan nukleotida dengan sampel yang lain.

*Chromas Pro* merupakan perangkat lunak bioinformatika yang digunakan untuk mengedit dan menganalisis hasil sekuens yang masih mengalami *double*

*peak* atau *noise*. Program ini digunakan untuk menyatukan hasil sekuens dari primer *reverse* dan *forward*. Urutan basa nukleotida yang masih terdapat *noise* akan dihapus pada urutan tersebut, apabila sudah menunjukkan angka 0 pada hasil trimm maka hasil sekuens tersebut dianggap sudah baik. Selanjutnya hasil sekuens yang telah diedit disejajarkan oleh perangkat lunak MEGA 5 dan NCBI, kedua perangkat lunak bioinformatika ini sama-sama digunakan untuk membandingkan urutan hasil sekuens dan dibandingkan dengan data yang sudah ada pada NCBI atau data-data yang didapat pada penelitian.

Hasil chromatogram sekuens fragmen gen lektin diatas setelah dilakukan pengeditan dilihat pada Gambar 10a dan 10b. Urutan sekuens yang telah diedit dianalisis BLAST untuk mengetahui perbedaan atau kesamaan antara titik tersebut.

## **2. Sekuens biji kacang kedelai *detam 1* dan *detam 2* dengan aplikasi BLAST**

Teknik BLAST dilakukan untuk tujuan membandingkan data sekuens fragmen gen lektin biji kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387pb dengan data sekuens gen lektin pada NCBI. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

Cara untuk mengetahui persentase penyejajaran sekuens fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387pb adalah dengan

menggunakan perangkat lunak Mega 5 untuk membandingkan data sekuen fragmen gen lektin biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* yang terdapat di NCBI. Penyejajaran fragmen gen lektin dilakukan pada posisi 33-892, penyejajaran pada program BLAST dimulai dengan bagian yang memiliki nilai kesamaan yang tinggi sedangkan pada urutan yang memiliki ketidaksamaan yang cukup tinggi akan dipotong (*cut-off*). Sistem tersebut menghasilkan persentase penyejajaran yang tinggi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Persentase hasil sekuens fragmen gen lektin sepanjang 387pb yang telah disejajarkan dengan data gen lektin pada NCBI diperlihatkan pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Deretan Hasil Sekuens dengan NCBI

Penyejajaran	Persentase Homolog nukleotida (%)
Kacang kedelai <i>Detam 1</i> - NCBI	100
Kacang kedelai <i>Detam 2</i> - NCBI	100

Penyejajaran hasil sekuens fragmen gen lektin kacang kedelai baik kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387pb dimulai pada posisi ke 33-892 urutan nukleotida gen lektin pada NCBI. Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 1* sepanjang 387pb dengan data gen lektin pada NCBI dapat dilihat pada Gambar 12a, sedangkan Penyejajaran urutan nukleotida fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 2* sepanjang 387pb dengan data gen lektin pada NCBI dapat dilihat pada Gambar 12b. Nomor akses untuk hasil penyejajaran antara kacang kedelai

*Detam 1*, *Detam 2* dengan data gen lektin pada NCBI dapat dilihat pada Gambar 11.

### **PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA**

NCBI Reference Sequence: XM\_003518752.3

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

---

LOCUS XM\_003518752 1032 bp mRNA linear PLN 25-NOV-2015  
 DEFINITION PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA.  
 ACCESSION XM\_003518752  
 VERSION XM\_003518752.3 GI:955305602  
 DBLINK BioProject: [PRJNA48389](#)  
 KEYWORDS RefSeq.  
 SOURCE Glycine max (soybean)  
 ORGANISM [Glycine max](#)  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;  
 Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae;  
 Phaseoleae; Glycine; Soja.

**Gambar 11.** Nomor Akses Hasil Penyejajaran Gen Lektin *Detam 1*, *Detam 2* dengan Data Gen Lektin pada NCBI

**Hasil BLAST Sekuens Nukleotida Kacang Kedelai**  
*Detam 1*

PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA  
Sequence ID: [gi|955305602|ref|XM\\_003518752.3](#) Length: 1032 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 1027 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1849 bits(2050)	0.0	1025/1025(100%)	0/1025(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCATCACAGTGC	ATGCATCACAGTGC		60
Sbjct 3	ATGCATCACAGTGC	ATGCATCACAGTGC		62
Query 61	GAATGTGGTTGTAT	GAATGTGGTTGTAT		120
Sbjct 63	GAATGTGGTTGTAT	GAATGTGGTTGTAT		122
Query 121	GGCAAACTCAGCGG	GGCAAACTCAGCGG		180
Sbjct 123	GGCAAACTCAGCGG	GGCAAACTCAGCGG		182
Query 181	CATGATCCTCCAAG	CATGATCCTCCAAG		240
Sbjct 183	CATGATCCTCCAAG	CATGATCCTCCAAG		242
Query 241	TGACGAAAACGGCAC	TGACGAAAACGGCAC		300
Sbjct 243	TGACGAAAACGGCAC	TGACGAAAACGGCAC		302

**Gambar 12a.** Penyejajaran Urutan Nukleotida Fragmen Gen Lektin Kacang Kedelai *Detam 1* Sepanjang 387pb dengan Data Gen Lektin LOC100818710 pada NCBI

**Hasil BLAST Sekuens Nukleotida Kacang Kedelai**  
*Detam 2*

PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA  
Sequence ID: [gi|955305602|ref|XM\\_003518752.3](#) Length: 1032 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 1027 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1849 bits(2050)	0.0	1025/1025(100%)	0/1025(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCATCACAGTGC	ATGCATCACAGTGC		60
Sbjct 3	ATGCATCACAGTGC	ATGCATCACAGTGC		62
Query 61	GAATGTGGTTGTAT	GAATGTGGTTGTAT		120
Sbjct 63	GAATGTGGTTGTAT	GAATGTGGTTGTAT		122
Query 121	GGCAAACTCAGCGG	GGCAAACTCAGCGG		180
Sbjct 123	GGCAAACTCAGCGG	GGCAAACTCAGCGG		182
Query 181	CATGATCCTCCAAG	CATGATCCTCCAAG		240
Sbjct 183	CATGATCCTCCAAG	CATGATCCTCCAAG		242
Query 241	TGACGAAAACGGCAC	TGACGAAAACGGCAC		300
Sbjct 243	TGACGAAAACGGCAC	TGACGAAAACGGCAC		302

**Gambar 12b.** Penyejajaran Urutan Nukleotida Fragmen Gen Lektin Biji Kacang Kedelai *Detam 2* Sepanjang 387pb dengan Data Gen Lektin LOC100818710 pada NCBI



Hasil BLAST Sekuens Nukleotida Gen Lektin *Detam 1* dengan Gen Lektin  
*Phaseolus vulgaris* pada NCBI

Phaseolus vulgaris pha-L gene for phytohemagglutinin, clone 4-13  
Sequence ID: [gii19744147/lemb/AJ439617.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gii19744147/lemb/AJ439617.1) Length: 822 Number of Matches: 1

Range 1: 196 to 286 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
93.3 bits(102)	3e-15	75/91(82%)	0/91(0%)	Plus/Plus
Query 84	TCTCTGGTCGCGCCCTCTACTCCACCCCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTAGC	143		
Sbjct 196	TCTCTGGGCGCGCCTTCTACTCCGCCCCATCCAAATCTGGGACAAAACCACCGGCACC	255		
Query 144	GTGCCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCA	174		
Sbjct 256	GTGCCAGCTTCGCCACCTCCTTCAACTTCA	286		

**Gambar 12c.** Penyejajaran Urutan Nukleotida Fragmen Gen Lektin Biji Kacang Kedelai *Detam 1* Sepanjang 387pb dengan Data Gen Lektin *Phaseolus vulgaris* pada NCBI

Hasil BLAST Sekuens Nukleotida Gen Lektin *Detam 2* dengan Gen Lektin  
*Phaseolus vulgaris* pada NCBI

Phaseolus vulgaris pha-L gene for phytohemagglutinin, clone 4-13  
Sequence ID: [gii19744147/lemb/AJ439617.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gii19744147/lemb/AJ439617.1) Length: 822 Number of Matches: 1

Range 1: 196 to 286 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
93.3 bits(102)	3e-15	75/91(82%)	0/91(0%)	Plus/Plus
Query 84	TCTCTGGTCGCGCCCTCTACTCCACCCCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTAGC	143		
Sbjct 196	TCTCTGGGCGCGCCTTCTACTCCGCCCCATCCAAATCTGGGACAAAACCACCGGCACC	255		
Query 144	GTGCCAGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCA	174		
Sbjct 256	GTGCCAGCTTCGCCACCTCCTTCAACTTCA	286		

**Gambar 12d.** Penyejajaran Urutan Nukleotida Fragmen Gen Lektin Biji Kacang Kedelai *Detam 2* Sepanjang 387pb dengan Data Gen Lektin *Phaseolus vulgaris* pada NCBI

Berdasarkan hasil sekuens kacang kedelai *Detam 1* (Gambar 12a) didapatkan bahwa fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* sepanjang 387pb dengan data gen lektin pada NCBI memiliki kesamaan persentase 100%, begitu juga dengan hasil sekuens kacang kedelai *Detam 2* (Gambar 12b) didapatkan bahwa fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 2* sepanjang 387pb dengan data gen lektin pada NCBI memiliki kesamaan 100%. Hal ini dikarenakan primer yang digunakan sesuai dengan panjang basa nukleotida target yang diinginkan. Pemotongan primer dilakukan pada urutan nukleotida posisi ke-33, posisi tersebut merupakan titik awal adanya gen lektin yaitu adanya gugus glikosilasi.

Penyejajaran urutan nukleotida juga dilakukan pada hasil sekuens fragmen gen lektin biji kacang kedelai *Detam 1* sepanjang 387pb dengan hasil sekuens fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 2* sepanjang 387pb. Hasil yang didapatkan juga menunjukkan persentase 100%.

Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan sangat tepat dan dikatakan berhasil karena sesuai dengan target yang diinginkan yaitu gen lektin dengan panjang fragmen 387pb. Primer dikatakan berhasil bila memiliki panjang basa oligonukleotida antara 18-24 basa, selanjutnya memiliki urutan basa-basa spesifik untuk melekat pada DNA cetakan, selain itu tidak terdapat basa-basa yang berkomplemen pada ujung 3' sehingga terjadi dimer, dan komposisi basa sitosin dan guanin adalah 50% dari seluruh basa. Selanjutnya

dua primer yang di pasangkan memiliki suhu *melting* yang tidak berbeda jauh (Iserte, 2013).

Sedangkan fragmen gen lektin pada biji kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* disejajarkan juga dengan data gen lektin kacang kedelai varietas lain pada NCBI ditunjukkan pada gambar 12c dan 12d memiliki kesamaan 82% dengan perbedaan similaritas pada beberapa pasang basa nukleotida. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat variasi genetik pada kelompok kacang kedelai dilihat dari gen lektin yang dimiliki.

## BAB V

### KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Telah berhasil teridentifikasi urutan nukleotida fragmen gen lektin pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.
2. Fragmen gen lektin kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* sepanjang 387 pb memiliki kesamaan 100 % dengan data gen lektin pada NCBI.

#### B. Implikasi

Data urutan nukleotida fragmen gen lektin sepanjang 387 pb dapat digunakan sebagai data acuan untuk analisis gen lektin secara utuh pada kacang kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*.

#### C. Saran

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan desain primer gen lektin secara keseluruhan serta dapat diaplikasikan dengan diinsersi ke dalam embrio tanaman yang rentan terhadap pathogen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adie, M.M dan A. Krisnawati. 2007. *Biologi Tanaman Kedelai*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Aird, D., M.G Ross., W.S Chen., M. Danielsson., T. Fennell., C. Russ., D.B. Jaffe., C. Nusbaum., A. Gnirke. 2011. Analyzing and Minimizing PCR Amplification Bias in Illumina Sequencing Libraries. *Genome Biology*, 12: R18.
- BALITKABI. 2008. *Deskripsi Varietas Unggul Kacang-kacangan dan Umbiumbian*. Balai Penelitian Tanaman Kacang-kacangan dan Umbiumbian, Malang.171 hlm.
- Bartlett, John M. S. dan D. Stirling. 2003. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Oxford, Humana, Blackwell Corporation.
- Bhol, C.S. 2012. *Isolation and Characterization of Soybean (Glycine max) Lectin*. Departmen of Life Science National Institute of Technology Rourkela-769008, Odisha.
- Cabral, H., M.T. Ruiz., C.M.A. Carareto., dan G.O. Bonilla-Rodriguez. 2000. A plant proteinase, extracted from Bromelia fastuosa, as an alternative to proteinase K for DNA extraction. *Dros. Inf. Serv.* 83:178-185.
- Campbell, N.A., B.R. Jane, G.M. Lawrence, 2000, *Biologi*. Jilid 1 Edisi Kelima. Jakarta: Erlangga.
- Chen, H., M. Rangasamy., S.Y. Tan., H. Wang., B.D. Siegfrie. 2010. Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles. *PLoS ONE*, 5 (8): e11963.
- Clark, M.S. 1997. *Plant Molecular Biology*. Lab Fox. BIOS Scientific Publisher Limited. UK.
- Dell'Anno, A, M. Fabiano, G. C. A. Duineveld, A. Kok dan R. Danovaro. 1998. Nucleic Acid (DNA, RNA) Quantification and RNA/DNA Ratio Determination in Marine Sediments: Comparison of Spectrophotometric, Fluorometric and High Performance Liquid Chromatography Methods and Estimation of Detrital DNA. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (9): 3238-3245.
- Dodd, R.B dan K. Drickamer. 2001. Lectin-like Protein In Model Organisms: Implicatio of Evolution of Carbohydrate-binding Activity. *Glycobiology*. Vol. 11 No.5 pp 71R-79R, 2001. UK.

- Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design. *African Journal of Biotechnology*, 2 (5): 91-95.
- Fachruddin, L. 2000. *Budidaya Kacang-kacangan*. Kanisius : Yogyakarta.
- Fang, E.F., W. JH., L. P., dan Ng TB. 2010. Biochemical and Functional Properties of A Lectin Purified From Korean Large Black Soybeans-A Cultivar of *Glycine max*. PubMed-NCBI. 17(6): 690-8.
- Gade, W., *et al.* 1981. The Isolation and Characterization of a Root Lectin from Soybean (*Glycine max* (L), Cultivar Chippewa). *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 256, No. 24, Issue of December 25, pp. 12905-12910, 1981. USA.
- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekuler*. Bandung: FMIPA UNPAD.
- Hidayat, O. D. 1985. Morfologi Tanaman Kedelai. Hal 73-86. Dalam S. Somaatmadja *et al.* (Eds.). Puslitbangtan : Bogor.
- Irfatongga, G.A., S. Purwanti., dan R. Rabaniyah. Periode Kritis Kedelai Hitam (*Glycine max* (L.) Merrill) Terhadap Gulma, Pengaruhnya pada Hasil dan Kualitas Benih Selama Penyimpanan. 2009. *Jurnal Penelitian*. Yogyakarta: UGM.
- Irwan, A. 2006. Budidaya Tanaman Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill). *Skripsi*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Iserte, J.A. 2013. Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Res Int* 2013:38364.
- Kolmodin dan Birch. 2002. *Polymeration Chain Reaction: Basic Priciple and Routine Practice*. PCR Cloning Protocols 2<sup>nd</sup> Edition: 9-10.
- Lewis, M. 2011. *Agarose Gel Electrophoresis (Basic Method)*. Biological Protocols. England: University of Liverpool.
- Lis, H., dan N. Sharon. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3468-3476
- Lu, Y. dan K. Morimoto. 2009. Is Habitual Alcohol Drinking Associated with Reduced Electrophoretic DNA Migration in Peripheral Blood Leukocytes from *ALDH2*-Deficient Male Japanese?. *Mutagenesis*, 24 (4): 303–308.
- McPherson, M.J. dan S.G Møller. 2006. *PCR Second Edition*. New York: Taylor & Francis Group.
- Muladno. 2010. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Edisi kedua. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.

- NCBI. 2016. BLAST. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Diakses pada bulan Maret 2016
- Olsen, J. 2008. *Introduction to "Primer Design" for PCR*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- PDB. 2016. RCSB. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org). Diakses pada bulan Maret 2016.
- Peumans, W.J. dan V. E. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347.
- Pueppke, S.G. 1979. Purification and characterization of a lectin from seeds of the winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC. *Biochem.Biophys.Acta.* 581: 63-70.
- Puspitaningrum, R., R. Amelia., Ernawati., dan Adisyahputra. 2015. Fragment DNA 387BP Gene Lectin of Soybean (*Glycine max* (L.) Meriil). Jakarta: Universitas Negeri Jakarta.
- Putra, S. 1999. *Biologi Molekuler Kedokteran*. Surabaya: Erlangga University Press.
- Rachmawati, M. 2010. Analisis Perdagangan Kedelai di Indonesia (Penerapan Model Armington). Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rukmana, S. K. dan Y. Yuniarsih. 1996. *Kedelai, Budidaya Pasca Panen*. Kanisius : Yogyakarta
- Sharpe, N. 2005. *Recipes for Buffers and Other Laboratory Solutions Used in Electrophoresis, PCR and DNA Extraction*. Canada: Department of Biology, Queen's University.
- Sulistyaingsih, E. 2007. Polymeration Chain Reaction: Era Baru Diagnosis dan Manajemen Penyakit Infeksi. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Surzycki, S. 2003. *Human Molecular Biology*. United Kingdom: Blackwell Science Publishing Company.
- Tengel, C., P. Schüßler., E. Setzke., J. Balles., dan M. Sprenger-Haußels. 2001. PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs. *BioTechniques* 31:426-429 (August 2001).
- Untergasser, A., L. Cutcutache., T. Koressaar., J. Ye., B.C. Faircloth., M. Remm., and S.G. Rozen. 2012. Primer 3-New Capabilities and Interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15).

Uruc, K., D.D Yilmaz, 2008. Effect Of Cadmium, Lead and Nickel on Imbibition, Water Uptake and Germination for The Seeds Of Different Plants. *Jurnal Penelitian*. Dumplinar University: Turkey.

Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Saintek*. Vol 5 No 6 Th 2010.

Yuwono, T. 2009. *Biologi Molekular*. Erlangga : Jakarta.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Desain Primer Gen Lektin Sepanjang 387pb

Data gen lektin pada (*Glycine max* (L.) Merrill) di ambil dari [www.ncbi.com](http://www.ncbi.com), maka diperoleh origin DNA :

```
1 atgcatcaca gtgcaattta gctgaagcaa agcaatggct acttcaaagt
tgaaaaccca
61 gaatgtgggt gtatctctct ccctaacctt aaccttggtg ctggtgctac
tgaccagcaa
121 ggcaactca gcggaactg tttctttcag ctggaacaag ttcgtgccga
agcaacaaaa
181 catgatcctc caaggagacg ctattgtgac ctctcggga aagttacaac
tcaataaggt
241 tgacgaaaac ggcaccccaa aaccctcgtc tcttggtcgc gcccttact
ccaccccat
301 ccacatttgg gacaaagaaa ccggtagcgt tgccagcttc gccgcttct
tcaacttcac
361 cttctatgcc cctgacacaa aaaggcttgc agatgggctt gccttctttc
tcgcaccaat
421 tgacactaag ccacaaacac atgcaggta tcttggtcct ttcaacgaaa
acgagtctgg
481 tgatcaagtc gtcgctgttg agtttgacac tttccggaac tcttgggatc
caccaaatcc
541 acacatcgga attaacgtca attctatcag atccatcaaa acgacgtctt
gggatttggc
601 caacaataaa gtagccaagg ttctcattac ctatgatgcc tccaccagcc
tcttggttgc
661 ttctttggtc tacccttcac agagaaccag caatatictc tccgatgtgg
tcgatttgaa
721 gacttctctt cccgagtggg tgaggatagg gttctctgct gccacgggac
tcgacatacc
781 tggggaatcg catgacgtgc tttcttggtc ttttgcttcc aatttgccac
acgctagcag
841 taacattgat ctttggatc ttacaagctt tgtggtgcat gaggccatct
aaatgtgaca
901 gatcgaagga agaaagtgta ataagacgac tctcactact cgatcgctag
tgattgtcat
961 tgttatatat aataatgta tctttcacia cttatcgtaa tgcattgtaa
actataacac
1021 attaa
```

Kemudian ditemukan daerah open reading frame (ORF), berdasarkan data origin diatas maka daerah ORF terdapat pada kodon urutan ke 35-892 (garis kuning). Langkah selanjutnya menentukan primer yang akan dibuat:

**Foward primer : gcaatggctacttcaaagttg (21bp), %GC : 42.9%.**

**Reverse primer : ccggtagattacactgtctagc (23bp), %GC : 47.8%.**

Berat molekul yang akan diambil sebesar 874 bp. Karena berat molekul ini dianggap besar maka diperlukan penelusuran lebih lanjut mengenai letak gugus lektin pada gen lektin tersebut melalui web <http://www.uniprot.org/uniprot/P05046> maka diperoleh keterangan letak gugus lektin pada posisi asam amino urutan ke 33-285.

## Data Asam Amino dari uniprot

### Molecule processing

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view	Feature identifier	Actions
Signal peptide <sup>i</sup>	1 - 32	32				<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>
Chain <sup>i</sup>	33 - 285	253	Lectin		PRO_0000017647	<a href="#">Add</a> <a href="#">BLAST</a>

### Amino acid modifications

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view	Feature identifier	Actions
Glycosylation <sup>i</sup>	107 - 107	1	N-linked (GlcNAc...)			

Dengan kode asam amino urutan asam amino sebagai berikut:

### Sequence Feature

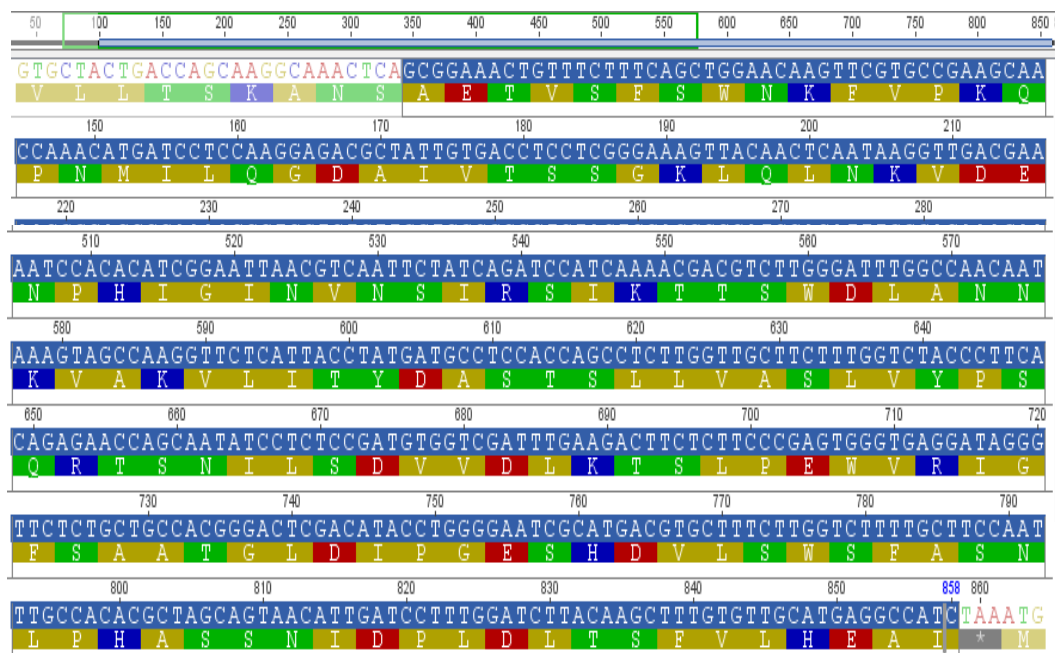
Entry & Position(s)	P05046[33-285]
Description	Lectin, Glycine max
Feature key	Chain
Feature identifier	PRO_0000017647

```

      10      20      30      40      50
MATSRLKIQN VVVSLSLILT LVLVLLTSKA NSAETVSWF NKFPVKQPNM
      60      70      80      90     100
ILQGDALVTS SGKLQLNKVD ENGTPKPSSL GRALYSTPIH IWDKETGSVA
     110     120     130     140     150
SFAASFNFTE YAPDTKRLAD GLAPFLAPID TKPQTHAGYL GLFNENESGD
     160     170     180     190     200
QVVAVEFDTE RNSWDPPNPH IGINVNSIRS IKTTSWDLAN NKVAKVLITY
     210     220     230     240     250
DASTSLLVAS LVYPSQRTSN ILSDVVDLKT SLPEWVRIGF SAATGLDIPG
     260     270     280
ESHVDLSWSF ASNLPASSN IDPLDLTSFV LHEAI

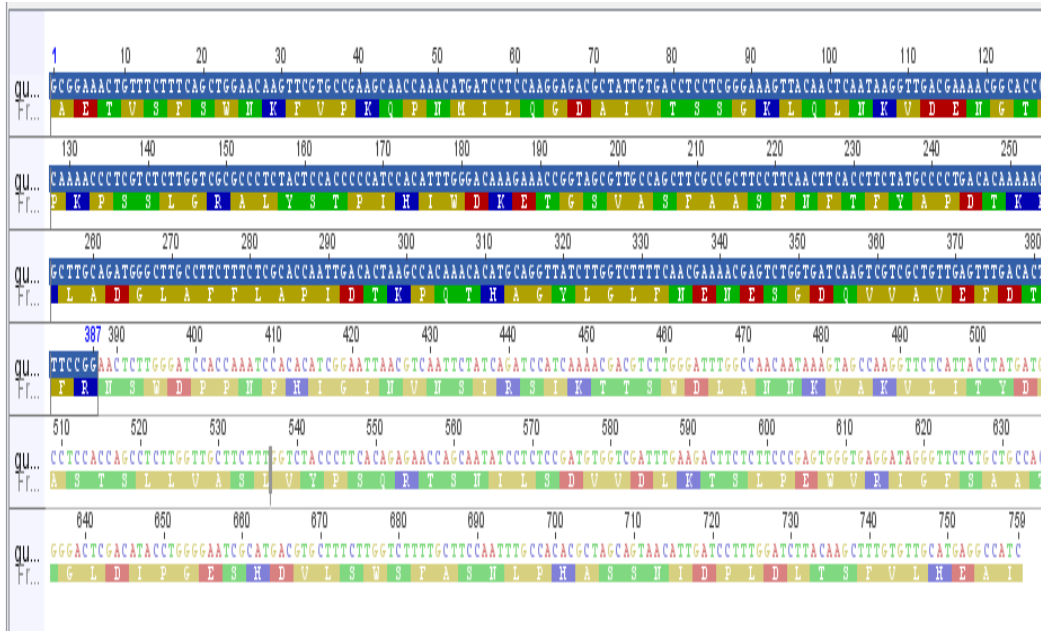
```

Gugus lektin diperkirakan terletak pada kodon ke 99 dengan asumsi  $33 \times 3 = 99$ , untuk memastikannya dapat digunakan program geneious yang diperoleh melalui [www.geneious.com](http://www.geneious.com) :



Dari urutan nukleotida tersebut diperoleh 759 bp maka dapat dilakukan desain primer gen lektin tepat pada gugus lektin sebagai berikut :

GCGGAAACTGTTTCTTTCAGCTGGAACAAGTTCGTGCCGAAGCAACCAAACATGATCCTCCAAGGAGACGC  
TATTGTGACCTCCTCGGGAAAGTTACAACCTCAATAAGGTTGACGAAAACGGCACCCCAAACCCCTCGTCTC  
TTGGTGC GCGCCCTCTACTCCACCCCATCCACATTTGGGACAAAGAAACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCGCC  
GCTTCCTTCAACTTCACCTTCTATGCCCTGACACAAAAGGCTTGCAGATGGGCTTGCCTTCTTTCTCGC  
ACCAATTGACACTAAGCCACAAACACATGCAGGTTATCTTGGTCTTTTCAACGAAAACGAGTCTGGTGATC  
AAGTCGTCGCTGTTGAGTTTGACACTTCCGGAACCTTGGGATCCACCAAATCCACACATCGGAATTAAC  
GTCAATTCTATCAGATCCATCAAACGACGCTTGGGATTTGGCCAACAATAAAGTAGCCAAGGTTCTCAT  
TACCTATGATGCCTCCACCAGCCTTGGTTGCTTCTTGGTCTACCCTTACAGAGAACCAGCAATATCC  
TCTCCGATGTGGTCGATTTGAAGACTTCTCTTCCCGAGTGGGTGAGGATAGGGTTCTCTGCTGCCACGGGA  
CTCGACATACCTGGGGAATCGCATGACGTGCTTCTTGGTCTTTTGGTTCCTTCAATTTGCCACACGCTAGCAG  
TAACATTGATCCTTTGGATCTTACAAGCTTTGTGTTGCATGAGGCCATC



Forward Primer

gcggaactgtttctttcagctggaacaagttcgtgccgaagcaaccaaacatgatcctccaaggagacgctattgtgacctc  
ctcgggaaagttacaactcaataaggttgacgaaaacggcaccccaaacctcgtctcttggtcgcccctctactccacc  
ccatccacatttgggacaaagaaccggttagcgttgccagcttcgccgcttcttcaactcaccttctatgccctgacacaa

aaaggctgcagatgggcttgcccttttctgcaccaattgacactaagccacaacacatgcaggttatcttggcttttcaa  
cgaaaacgagtctggtgatcaagtcgctgctggtgagttgacactttcgg



Reverse Primer

**Foward primer : gcggaactgtttctttcagctgg (24bp), %GC : 50%.**

**Reverse primer : ccggaagtgcaactcaacagcg(25bp), %GC : 52%.**

Berat molekul yang akan diambil sebesar 387bp. Dengan asumsi gugus yang terambil ialah gugus lektin dan glycosylation.

Lampiran 2. Alat dan Bahan Penelitian Analisis Fragmen Gen Lektin pada Biji Kacang Kedelai *Detam 1* dan *Detam 2*



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

**Gambar.** Alat untuk Isolasi DNA Genom Biji Kacang Kedelai (*Glycine max*)  
**(a)** Vortex DAAD; **(b)** Penangas Air AS ONE TRW-42TP 80 *High Temperature Version*; **(c)** Pipet Mikro: *BIOHIT* Ukuran 0,5-10  $\mu\text{L}$ ; *BIO RAD* ukuran 100-1.000  $\mu\text{L}$ ; **(d)** Mikrotip *Biologix* Ukuran 10  $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L}$ , dan 1.000 $\mu\text{L}$ ; Alumunium Foil; Plastik *Wrap*; dan Sarung Tangan *Hand Seal*; **(e)** Mikro Vakum DAAD



(f)



(g)



(h)

**Gambar.** Alat dan Bahan yang Digunakan untuk Elektroforesis (f) Spektrofotometer *Maestro Nanodrop*; (g) *Maestro Buffer Nucleic Acid MR- 031203 1ml*; (h) *Agarose LE analytical grade Promega* dan *KAPA Universal DNA Ladder*



(i)



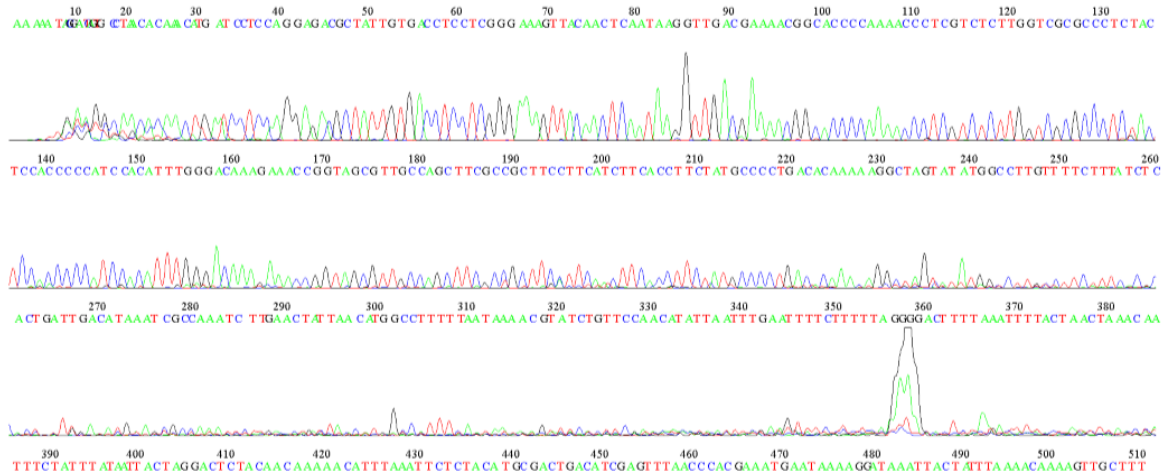
(j)

**Gambar.** Alat dan Bahan yang Digunakan untuk PCR (i) PCR *Techne-1000*; (j) *Gel Doc System Biometra Digital*



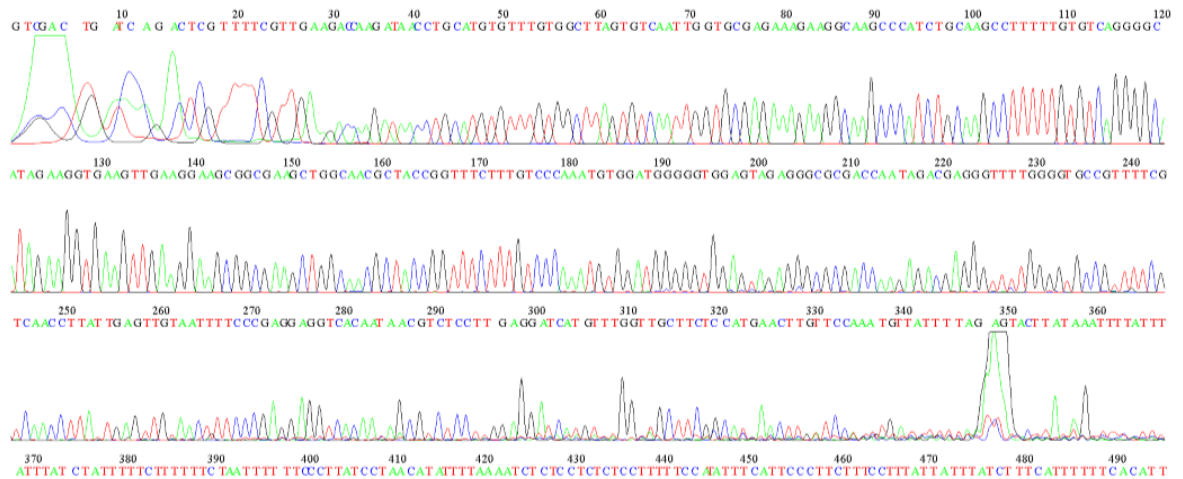
### Lampiran 3a. Grafik Hasil Sekuensing Fragmen Gen Lektin *Detam 1* Sepanjang 387 pb

File: D1\_Leic-Forward.ab1 Run Ended: 2016/2/16 4:6:8 Signal G:621 A:744 C:860 T:692  
 Sample: D1\_Leic-Forward Lane: 91 Base spacing: -16.163063 511 bases in 5983 scans Page 1 of 1



(a)

File: D1\_Leic-Reverse.ab1 Run Ended: 2016/2/16 4:6:8 Signal G:1091 A:820 C:701 T:784  
 Sample: D1\_Leic-Reverse Lane: 89 Base spacing: -16.163063 503 bases in 6091 scans Page 1 of 1

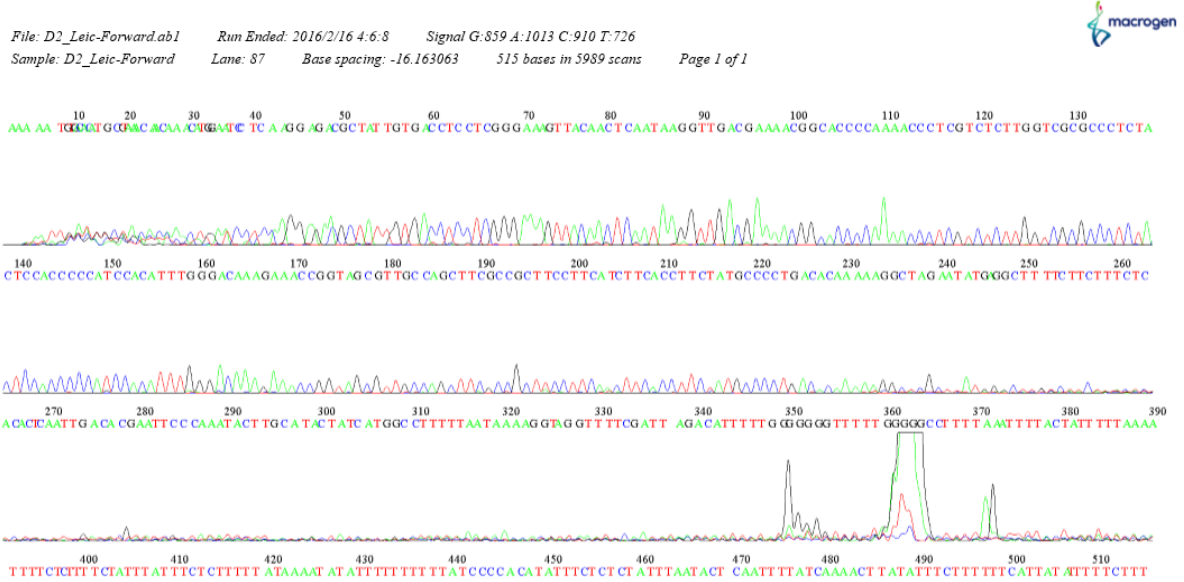


(b)

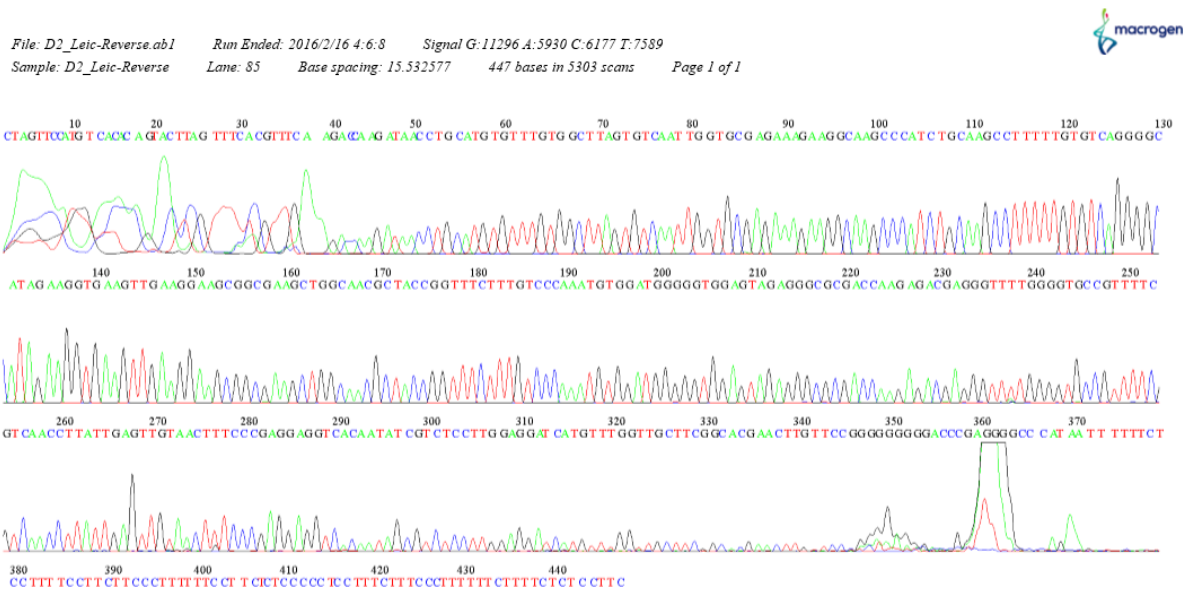
**Gambar (a)** Hasil Kromatogram Sekuensing Primer *Leic Forward* Kacang Kedelai *Detam 1* Sepanjang 387pb

**(b)** Hasil Kromatogram Sekuensing Primer *Leic Reverse* Kacang Kedelai *Detam 1* Sepanjang 387pb

Lampiran 3b. Grafik Hasil Sekuensing Fragmen Gen Lektin *Detam 2* Sepanjang 387 pb



(a)



(b)

**Gambar (a)** Hasil Kromatogram Sekuensing Primer *Leic Forward* Kacang Kedelai *Detam 2* Sepanjang 387pb

**(b)** Hasil Kromatogram Sekuensing Primer *Leic Reverse* Kacang Kedelai *Detam 2* Sepanjang 387pb

**Lampiran 4. Fragmen Gen Lektin Sepanjang 387 pb pada Kacang Kedelai *Detam 1* dan *Detam 2* Disejajarkan dengan Data Gen Lektin LOC1008718710 Pada NCBI**

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA</b>	1849	1849	100%	0.0	100%	<a href="#">gi955305602 XM_003518752.3</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct for pENG1-02-19 insert containing Glycine max partial Le1 gene</a>	1838	1838	99%	0.0	99%	<a href="#">gi170005943 J0821.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct SBA-9-TM2 gene for soybean agglutinin-lamivudine 2 fusion protein, complete cds</a>	1543	1543	83%	0.0	100%	<a href="#">gi295841582 AB511017.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">GM reference vector pTLER, partial sequence</a>	922	922	50%	0.0	99%	<a href="#">gi408689209 X434028.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">GM reference vector pTLH13, partial sequence</a>	922	922	50%	0.0	99%	<a href="#">gi408689209 X434027.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max lectin (Le2) gene, complete cds</a>	823	823	89%	0.0	80%	<a href="#">gi42794341 AY342212.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max putative truncated lectin (Le2) gene, promoter region and complete cds</a>	812	812	89%	0.0	80%	<a href="#">gi158534859 EJ070414.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Glycine max lectin (LOC547726), mRNA</a>	755	755	84%	0.0	79%	<a href="#">gi955343879 XM_003535888.3</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max lectin (Le2) mRNA, partial cds</a>	668	668	71%	0.0	80%	<a href="#">gi42794341 AY342213.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max lectin (LOC732576), mRNA</a>	410	410	79%	3e-110	71%	<a href="#">gi380848782 NM_001250281.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max lectin (Le3) gene, promoter region and complete cds</a>	410	410	79%	3e-110	71%	<a href="#">gi158534861 EJ070415.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Soybean clone JCV-FL-Gm-12M6 unknown mRNA</a>	401	401	79%	1e-107	71%	<a href="#">gi255646228 BT098384.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Glycine max lectin DB58 (LOC100725957), mRNA</a>	336	336	80%	5e-88	70%	<a href="#">gi955345625 XM_003535822.3</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Glycine max cultivar Williams 82 lectin (Le4) gene, complete cds</a>	336	336	80%	5e-88	70%	<a href="#">gi208465308 FJ97345.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: Glycine max lectin DB58-like (LOC100783635), mRNA</a>	334	334	80%	2e-87	70%	<a href="#">gi955344009 XM_014762809.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Synthetic construct for pENG1-02-19 insert containing Glycine max partial Le1 gene</a>	291	291	17%	2e-74	96%	<a href="#">gi284506687 FN650622.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Musa domestica var. Burundese leaf protein, full length</a>	102	102	43%	7e-27	70%	<a href="#">gi177798963 AA047124.4</a>

---

GenBank - Send - [Change region shown](#)

### PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA

NCBI Reference Sequence: [XM\\_003518752.3](#)  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) [⊞](#)

LOCUS XM\_003518752 1032 bp mRNA linear PLN 25-NOV-2015  
 DEFINITION PREDICTED: Glycine max lectin (LOC100818710), mRNA.  
 ACCESSION XM\_003518752  
 VERSION XM\_003518752.3 GI:955305602  
 DBLINK BioProject: [PRJNA48399](#)  
 KEYWORDS RefSeq.  
 SOURCE Glycine max (soybean)  
 ORGANISM [Glycine max](#)  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
 Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;  
 Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae;  
 Phaseoleae; Glycine; Soja.  
 COMMENT MODEL [REFSEQ](#): This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence ([IM\\_014573354.1](#)) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by EST evidence.  
 Also see:  
[Documentation](#) of NCBI's Annotation Process  
 On Nov 25, 2015 this sequence version replaced gi:[571438293](#).  
 ##Genome-Annotation-Data-START##  
 Annotation Provider : NCBI  
 Annotation Status : Full annotation  
 Annotation Version : [Glycine max Annotation Release 102](#)  
 Annotation Pipeline : NCBI eukaryotic genome annotation pipeline  
 Annotation Software Version : [6.4](#)  
 Annotation Method : [Protein-based RefSeq Gene](#)

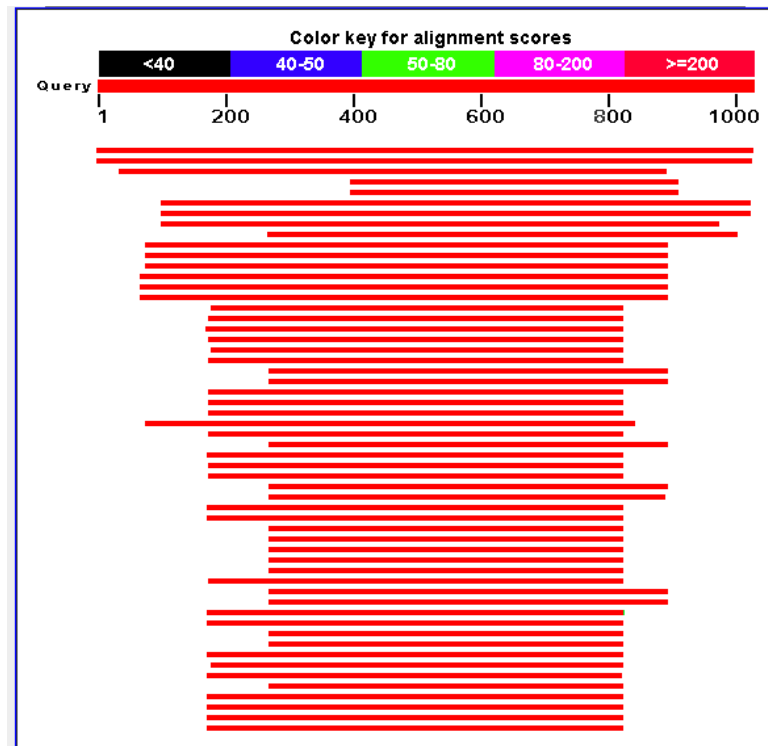
Analyze this sequence  
 Run BLAST  
 Pick Primers  
 Highlight Sequence Features  
 Find in this Sequence

Articles about the LOC100818710 gene  
 X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four I [Biochemistry, 1997]  
 X-ray crystal structure of the soybean agglutinin cross-linked with a blantene [Biochemistry, 1995]  
 cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. [Cell, 1983]  
[See all...](#)

Reference sequence information  
 RefSeq protein product  
 See the reference protein sequence for PREDICTED: lectin (XP\_003518800.1).

More about the gene LOC100818710  
[LOC100818710 gene](#)

**Lampiran 5. Color Key For Alignment Scores Fragmen Gen Lektin Sepanjang 387 pb Biji *Detam 1* dan *Detam 2***



**SURAT KETERANGAN**  
**Nomor : 03/Lab\_Bio.B/KP/I/2016**

Yang bertandatangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta, dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Devityas Argika Putri

NIM : 3425111415

Program Studi : Biologi

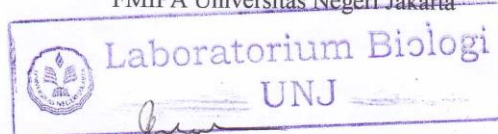
Telah melakukan kegiatan penelitian di Laboratorium Biokimia dan Molekuler, Laboratorium Biologi, FMIPA Universitas Negeri Jakarta dengan judul penelitian “Analisa Fragmen Gen lektin pada Biji Tanaman Kacang Kedelai Detam-1 dan Detam-2” pada bulan Oktober 2015 - Januari 2016, dibimbing oleh Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed dan Dr. Adisyahputra, MS.

Demikian surat keterangan ini kami buat untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Jakarta, 14 Maret 2016

Kepala Laboratorium Biologi

FMIPA Universitas Negeri Jakarta



Agung Sedayu, M.Sc

NIP. 19750911 200112 1 004

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Devityas Argika Putri  
No. Registrasi : 3425111415  
Jurusan : Biologi  
Program Studi : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul " ANALISIS FRAGMENT GEN LEKTIN PADA BIJI KACANG KEDELAI (*Glycine max* (L) Merril *DETAM 1* DAN *DETAM 2*)" adalah

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan pada bulan November 2015 – Januari 2016.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya tidak benar.

Jakarta, Juni 2016

Yang membuat pernyataan



Devityas Argika Putri

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



**Devityas Argika Putri.** Dilahirkan di Jakarta, 28 September 1993. Putri sulung dari Ibu Sugiarti dan Bapak Ari Hadiyanto, memiliki 3 saudara kandung. Beralamat di Jl.Manggarai Utara 1 Blok B/21, Jakarta Selatan. Pendidikan formal yang pernah ditempuh SDN Bojong

Rawalumbu IX lulus tahun 2005, SMPN 16 Bekasi lulus tahun 2008, dan SMAN 31 Jakarta lulus tahun 2011. Pada tahun 2011 penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Biologi di FMIPA Universitas Negeri Jakarta.

Pengalaman organisasi yang pernah diikuti selama masa perkuliahan diantaranya menjadi Biro Sekretaris Umum UKM UNJ (Unit Kesenian Mahasiswa Universitas Negeri Jakarta) periode 2013-2014, Biro Bidang 3 (Humas, Publikasi dan Insidental) UKM UNJ periode 2014-2015 dan menjadi Ketua Subunit Tari UKM UNJ Periode 2015-2016. Selama masa kuliah penulis pernah mengikuti kegiatan Cakrawala Biologi (CABI) pada tahun 2011, Workshop "Analyzing Stem Cell Using Real Time PCR" 2015, dan Asisten Praktikum mata kuliah Genetika 2013 – 2015, Asisten Praktikum mata kuliah Biokimia 2012-2013. Kemudian pada tahun 2014 penulis mengikuti Kuliah Kerja Lapangan di Pangandaran dan pada tahun yang sama penulis mengikuti Praktik Kerja Lapangan di Badan Pengawasan Obat dan Makanan.