

## DETERMINATION OF THE PARENTS BASED ON MOLECULAR ANALYSIS FOR SOYBEAN LINES DEVELOPMENT

Slamet<sup>1)\*</sup>, Nonon Saribanon<sup>2)</sup>, Saptowo Jumali Pardal<sup>1)</sup>, Tatang Mitra Setia<sup>2)</sup>, Reflinur<sup>3)</sup>  
dan Wening Enggarini<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Riset Tanaman Pangan, Organisasi Riset Pangan dan Pertanian, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia

<sup>2)</sup> Program Magister, Program Studi Biologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Nasional, Jl. Harsono RM No. 1, Ragunan, Pasar Minggu, Jakarta, 12550, Indonesia

<sup>3)</sup>Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 Mar 2022,

Revised 15 Jul 2022,

Accepted 25 Jul 2022,

Available online 30 Jul 2022

#### Keywords:

- ✓ *biosoy 1*,
- ✓ *biosoy 2*,
- ✓ *Demas*,
- ✓ *Tanggamus*,
- ✓ *Al tolerance*,
- ✓ *SSR markers*

\*corresponding author:

[slamet1969@gmail.com](mailto:slamet1969@gmail.com)

[https://doi.org/10.31938/jsn.v](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.391)

[12i3.391](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.391)

### ABSTRACT

*Soybean is the third most important food commodity in Indonesia, which is a cheap source of protein and rich in different nutritional contents for humans. This study aimed to analyze the four genotypes of the crossing parents using SSR primers and select one SSR polymorphic primer to confirm the F1 generation alleles compared to their parents. The research was conducted in the laboratory and greenhouse of the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD). The research activities included a polymorphic primers survey, population formation, and confirmation of crossing populations using one polymorphic primer. A total of 20 SSR primers were used to amplify the DNA of the four crossing parents (Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, and Tanggamus). The results of the polymorphic SSR survey showed that 6 SSR primers could distinguish the combination of Biosoy 2 vs Demas parents, then 7 SSR primers could distinguish the combination of Biosoy 1 vs Tanggamus and Biosoy 2 vs Tanggamus parents. Satt 406 polymorphic primer was chosen to analyze F1 hybrid lines of three crossings. Based on phenotypic observation, two individuals were suspected to be hybrid lines. Molecular analysis using Satt 406 showed that alleles from male parents were not found in 16 F1 individuals from the three crossings. Selection using molecular markers such as Satt 406 polymorphic SSR can help breeders screen heterozygous populations in F1 generations to check successful crossings.*

### ABSTRAK

#### Penentuan Tetua Berbasis Analisis Molekuler Untuk Pembentukan Galur Kedelai

Kedelai merupakan komoditas pangan penting ketiga di Indonesia yang dimanfaatkan sebagai sumber protein yang murah dan kaya berbagai kandungan gizi bagi manusia. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis 4 genotip tetua persilangan menggunakan primer SSR dan memilih satu primer polimorfik SSR untuk mengonfirmasi alel-alel generasi F1 dibandingkan dengan para tetuanya. Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen). Kegiatan penelitian terdiri dari survei primer polimorfik, pembentukan populasi, dan konfirmasi populasi persilangan menggunakan satu primer polimorfik. Sebanyak 20 primer SSR digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari empat tetua persilangan kedelai (Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, dan Tanggamus). Hasil survei polimorfisme SSR menunjukkan bahwa 6 primer SSR dapat membedakan kombinasi tetua Biosoy 2 vs Demas, serta 7 primer SSR dapat membedakan Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Primer polimorfik Satt 406 terpilih untuk menganalisis hibrida F1 dari tiga persilangan. Berdasarkan hasil pengamatan fenotipik, diperoleh 2 nomor individu F1 yang diduga sebagai generasi hibrida. Analisis molekuler menggunakan Satt 406 menunjukkan bahwa alel-alel dari tetua jantan tidak ditemukan pada 16 nomor tanaman dari 3 populasi persilangan. Seleksi menggunakan marka molekuler seperti SSR polimorfik Satt 406 membantu pemulia dalam menskrining populasi heterozigot pada generasi F1 untuk mengetahui keberhasilan persilangan.

Kata kunci: biosoy 1, biosoy 2, Demas, Tanggamus, toleransi Al, marka SSR





## PENDAHULUAN

Kedelai merupakan komoditas pangan penting ketiga di Indonesia yang dimanfaatkan sebagai sumber protein yang murah, dan kaya berbagai kandungan gizi yang bermanfaat bagi manusia (Krisnawati, 2017; Risliawati *et al.*, 2015). Kebutuhan kedelai baru dapat dipenuhi sebesar 40% dari produksi nasional. Masalah utamanya adalah produktivitas kedelai nasional masih rendah (Ashari, 2003). Kekurangan suplai kedelai sebesar 60% dipenuhi dari impor (BPS, 2021).

Salah satu faktor yang mempengaruhi penurunan produktivitas kedelai adalah cekaman abiotik yang disebabkan oleh sifat kemasaman tanah dan kadar Aluminium (Al) tinggi yang bersifat racun bagi tanaman. Menurut Mulyani & Sarwani (2013) lahan masam kadar Al tinggi tersedia luas di pulau-pulau besar di luar Pulau Jawa, namun tingkat produktivitas lahan cukup rendah terutama pada tanaman pangan padi, jagung dan kedelai.

Pemanfaatan lahan marginal dengan karakteristik masam dengan kadar Al tinggi secara ekonomis dan mudah dalam pengaplikasiannya yaitu dengan penggunaan varietas toleran (Reflinur & Lestari, 2015; Tasma, 2015). Pembentukan varietas unggul kedelai toleran dapat diawali dengan pemilihan calon tetua persilangan dan penentuan teknik introgresi sifat yang diinginkan (Carsono *et al.*, 2016). Kesuksesan pembentukan varietas unggul tanaman sangat ditentukan oleh tingkat keragaman bahan genetik yang tersedia. Semakin banyak materi genetik yang memiliki sifat-sifat target yang dievaluasi, semakin besar peluang didapatkannya tanaman dengan kombinasi genetik sesuai dengan yang diinginkan (Sitepu, *et al.*, 2015).

Kedelai varietas Tanggamus dan Demas merupakan varietas unggul yang adaptif di lahan kering masam. Keunggulan Tanggamus adalah tahan rebah, memiliki ketahanan moderat terhadap penyakit karat daun, polong tidak mudah pecah, ukuran biji sedang, bobot 100 biji 11 gram dan hasil rata-rata 1,22 t/ha. Varietas Demas memiliki keunggulan yaitu hasil rata-rata 1,7 t/ha, bobot 13 g, tahan terhadap penyakit karat daun (*Phakopsora pachyrhizi* Syd), tahan terhadap penggerek polong (*Etiella zinckenella*), agak rentan terhadap hama pengisap polong (*Riptortus linearis*), dan rentan terhadap hama ulat grayak (*Spodoptera litura* F.) (Balitkabi, 2016).

Salah satu pendekatan pemuliaan berbasis bioteknologi adalah penggunaan marka molekuler sebagai perangkat bantu yang populer dengan istilah *marker assisted selection* (MAS) yang merupakan komponen dari disiplin ilmu baru yaitu pemuliaan berbasis molekuler. Di antara bermacam-macam tipe marka yang berbasis *polymerase chain reaction* (PCR), *Simple Sequence Repeats* (SSR) dipertimbangkan sebagai sistem marka yang lebih tepat untuk berbagai aplikasi pada analisis genetik tanaman maupun dalam program pemuliaan (Reflinur & Lestari, 2015). Penelitian berbasis marka molekuler pada tanaman kedelai telah dilakukan untuk berbagai tujuan antara lain studi keragaman genetik (Chaerani *et al.*, 2011; Terryana *et al.*, 2017), pengembangan set marka untuk identifikasi varietas (Risliawati *et al.*, 2015), pemetaan genetik sifat toleran Al (Tasma *et al.*, 2015); deteksi insersi gen *MaMt2* pada tanaman transgenik toleran Al (Pardal & Suharsono, 2016), dan konfirmasi penurunan alel tetua donor pada populasi persilangan pertama pada tanaman kedelai (Lestari *et al.*, 2017).

Penanda SSR, juga dikenal sebagai mikrosatelit, biasanya digunakan untuk menjelaskan karakteristik genetik tumbuhan (Nuraida, 2012). Teknik ini memungkinkan pembacaan fragmen DNA yang lebih akurat (akurasi hingga 1 bp). Penanda SSR yang merupakan penanda mikrosatelit dapat mudah diamplifikasi menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR) karena tersebar luas di genom (Chaerani *et al.*, 2014). Selain itu, penanda SSR dapat digunakan dalam analisis genetik karena menunjukkan tingkat variasi alelik dan dapat direproduksi. Penanda SSR juga dilaporkan merupakan penanda kodominan yang dapat diterapkan praktis untuk mendukung program pemuliaan tanaman (Reflinur & Lestari, 2015), antara lain keberhasilan persilangan pada generasi F1 tanaman pisang (Rosalia *et al.*, 2020).

Keuntungan penggunaan marka molekuler sebagai agen seleksi adalah dapat mencapai sasaran target secara akurat, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, tidak merusak karena hanya perlu bagian kecil dari tanaman dan dapat dilakukan pada fase bibit (Santoso *et al.*, 2006; Reflinur & Lestari, 2015). Sedangkan kelemahan penggunaan penciri morfologi adalah bersifat terbatas, tidak tersedia pada setiap fase pertumbuhan dan sangat dipengaruhi lingkungan. Namun, penggunaan marka molekuler dan penciri morfologi dalam pelaksanaannya tidak saling

bertentangan, tetapi saling melengkapi (Santoso *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian kedelai terkait toleran Al telah dilakukan Giono *et al.* (2014) dan dilaporkan bahwa varietas Tanggamus memiliki nilai indeks bobot kering akar paling tinggi. Selain itu, perlakuan pada berbagai jenis media, varietas Tanggamus memiliki respon akar paling panjang dibanding dengan kedelai kuning varietas Anjasmoro (Eka *et al.*, 2015). Penelitian tersebut diperkuat Sudrajat (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa Tanggamus memiliki sifat konsisten adaptasi yang kuat pada lahan masam berkadar Al tinggi yang ditunjukkan oleh pertumbuhan akar dan jumlah polong. Kedelai varietas Demas toleran terhadap hasil uji adaptasi di lahan kering masam Lampung dan Kalimantan Selatan dengan rata-rata hasil biji 2,66 t/ha. Keunggulan lain dari Demas adalah tahan terhadap pecah polong. Pada kondisi kering, Demas di lapang masih memungkinkan untuk

dilakukan penundaan panen hingga 10 hari (Kementan, 2020). Kedelai varietas Tanggamus dan Demas termasuk kategori kedelai dengan adaptasi yang luas (Balitkabi, 2016).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyeleksi dan memperoleh primer SSR polimorfik untuk menganalisis 4 genotip tetua persilangan secara jelas dan mengonfirmasi kebenaran populasi tananaman kedelai generasi F<sub>1</sub> dari 3 kombinasi persilangan.

## BAHAN DAN METODE

### Survei Primer Polimorfik

Bahan genetik digunakan 4 genotipe kedelai calon tetua persilangan yaitu varietas Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, dan Tanggamus yang disurvei menggunakan marka molekuler SSR. Kedua puluh primer SSR yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer SSR pada Kegiatan Survei Primer Polimorfik

No.	Primer	Sekuens
1	Satt 070	F.5-AAAAATTAATACTAGAAAGACAAC-3 R. 5'-TGGCATTAGAAAAATGATATG-3'
2	Satt 100	F. 5-ACCTCATTGTCATATA-3 R. 5-TTGGAAAACAAGTAATAATAACA-3
3	Satt 144	F. 5-CGTCGCCATCACTATGAGAA-3' R. 5-CCATCTTGAGCAGAGTTGAAGTT-3'
4	Satt 182	F. 5-GGTCCACATGAAATGAAGGT-3' R. 5-TCTCAGCCTGCAAAGAAAA-3'
5	Satt 406	F. 5-GCGTGAGCATTTTTGTTT-3' R. 5-TGACGGGTTAATAGCAT-3'
6	Satt 125	F. 5-GGGACGAAACAAAGTCACAT-3 R. 5-GGGATGCTGTTATCAAAATCA-3
7	Satt 516	F. 5-GCGTTAGCACTATTTTTTACAAGA-3' R. 5-GCGCCGTTCTTACTTTTAT-3'
8	Satt 333	F. 5-GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA-3 R. 5-GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT-3
9	Satt 171	F. 5-TTGAGGGCTCCACACAGTT-3 R. 5-CAAAAGTTTATAACGTGTAGATTAA-3
10	Satt 551	F. 5-GAATATCACGCGAGAATTTTAC-3 R. 5-TATATGCGAACCCCTTACAAT-3
11	Satt 244	F. 5-GCGTCAACCGGTGAAAAAACCTA-3 R. 5-GCGTGCCTGGCAGTAGTCTATATC-3
12	Satt 249	F. 5-GCGGGTCAAATGCAAATTTTTT-3 R. 5-GGCCAGTGTGAGGGATTTAGAA-3
13	Satt 294	F. 5-GCGGGTCAAATGCAAATTTTTT-3 R. 5-GCGCTCAGTGTGAAAGTTGTTTCTAT-3
14	Satt 633	F. 5-GGGACACTATCGGCCTAGAAAGTT-3 R. 5-GGGTGATAAAGTTCCCCCTAAG-3
16	Satt 196	F. 5-TGAGCCCAACCTCCACATCTTT-3 R. 5-TGTGAATAAAAGAAATCCCCATTGA-3
15	Satt 143	F. 5-GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA-3 R. 5-GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT-3
17	Satt 520	F. 5-GCGGTGTGCAAGAGTGACA-3 R. 5-GCGCATTGGACTTTCTA-3
18	Satt 549	F. 5-GCGTGCTTCTTATATTAGGTGTTAGT-3 R. 5-GCGCGCAACAATCACTAGTACG-3
19	Satt 167	F. 5-GATTTACGGGTTACTTGGATTCAATA-3 R. 5-GCTACCCAATATGATACTCTACACAGT-3
20	Satt 449	F. 5-GCGTGCTTCTTATATTAGGTGTTAGT-3 R. 5-GCGCATTGGAGTTTTTGTCTTT-3

### Isolasi DNA

DNA diisolasi dari daun muda trifoliet umur berkisar 15 sampai 21 hari setelah tanam menggunakan bufer ekstraksi CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) sesuai prosedur (Doyle & Doyle, 1990). Pelet dicuci dengan 300  $\mu\text{L}$  etanol 70% selanjutnya dikering-anginkan selama 30 menit, dilarutkan pada kisaran 50 sampai 100  $\mu\text{L}$  larutan bufer TE (pH 8).

Uji kuantitatif dilakukan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop, Thermo Scientific, AS, sedangkan uji kualitatif dilakukan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%. Produk PCR divisualisasi di bawah sinar UV (alat GelDoc Bio-Rad). Larutan DNA stok kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 10 ng/ $\mu\text{L}$  untuk digunakan dalam kegiatan *polymeration chain reaction* (PCR).

### Amplifikasi DNA (PCR)

Penggandaan DNA dengan metode PCR (alat Thermocycler Bio-Rad). Komposisi reaksi PCR berdasarkan metode dari My Taq Red Mix (Bioline) terdiri dari 5  $\mu\text{L}$  PCR mix, 1  $\mu\text{L}$  primer SSR, 2  $\mu\text{L}$  DNA sampel, lalu ditambahkan ddH<sub>2</sub>O hingga volume total PCR 10  $\mu\text{L}$ .

Program reaksi amplifikasi berdasarkan Lestari *et al.*, (2017) dimulai dengan tahapan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 34 siklus yang terdiri atas tahapan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C, pemanjangan basa (*elongation*) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan proses akhir pemanjangan basa (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis pada gel agarosa 2% pada tegangan listrik 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan etidium bromida dan divisualisasi dengan alat GelDoc Bio-Rad.

### Pembentukan Populasi dan Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

#### Pembentukan Populasi Persilangan

Biji ditanam di dalam ember berlubang yang berisi media tanah gembur dicampur dengan pupuk kandang dengan dosis 200 gram per pot di rumah kaca. Tanaman dipelihara sesuai standar budidaya hingga berbunga, bunga yang masih kuncup dikastrasi kemudian disilangkan dengan menempelkan bunga jantan mekar di atas bunga betina. Bunga yang telah disilangkan ditandai dengan benang berwarna dan tanaman diberi label tanggal dan nama persilangan. Tanaman yang telah disilangkan ditempatkan pada tempat teduh

yang tidak mendapatkan sinar matahari langsung selama 5 (lima) hari. Polong-polong generasi F<sub>1</sub> hasil persilangan setelah masak dipanen dan dikeringkan hingga kadar air 10 persen dan disimpan pada suhu 5°C.

Biji generasi F<sub>1</sub> hasil persilangan ditanam, dirawat hingga dewasa, dan dibiarkan menyerbuk sendiri (*selfing*) hingga polong masak menghasilkan biji-biji generasi F<sub>2</sub>, atau disilang balik sesuai tujuan penelitian yang diinginkan.

#### Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

Bahan genetik yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 16 nomor tanaman generasi F<sub>1</sub> yang berasal dari 3 jenis persilangan yaitu 2 nomor dari Biosoy1/Tanggamus, 8 nomor dari Biosoy2/Tanggamus dan 6 nomor dari Biosoy2/Demas. Konfirmasi molekuler menggunakan primer SSR polimorfik terpilih yaitu Satt 406. Prosedur uji molekuler mengikuti prosedur pada survei primer SSR polimorfik. Hasil PCR selanjutnya disepariasi pada gel poliakrilamid 8% dengan komposisi 50 mL poliakrilamid 8%, amonium persulfat (APS) 500  $\mu\text{L}$ , dan tetraetilmetilendiamin (TEMED) 50  $\mu\text{L}$ . Hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan larutan etidium bromida dan divisualisasi di bawah sinar UV menggunakan alat GelDoc (Bio-Rad).

#### Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola pita polimorfik hasil visualisasi DNA antara populasi hasil persilangan dengan kedua tetua persilangannya. Skor 1 (satu) jika muncul alel atau pita dan skor 0 (nol) jika tidak muncul alel. Alel-alel (pola pita DNA) yang muncul sejajar dikategorikan sebagai monomorfik, dan jika alel-alel yang muncul berbeda ukuran atau tidak sejajar dikategorikan polimorfik. Tanaman-tanaman hasil persilangan yang terkonfirmasi positif F<sub>1</sub> mengandung alel dari kedua tetua donor berdasarkan marka molekuler, yaitu alel heterozigot yang serupa dengan kedua tetuanya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Survei Primer Polimorfik

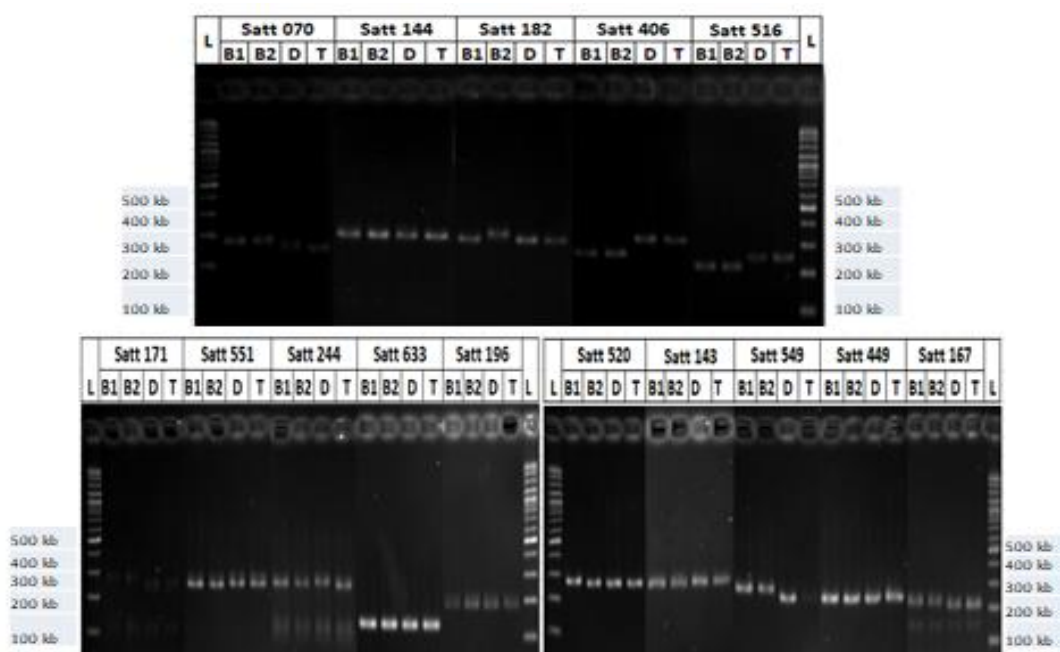
Hasil PCR dari 20 primer yang disurvei telah teramplifikasi sebanyak 15 primer, 8 primer menghasilkan pita polimorfik dan 7 primer pita monomorfik. Selebihnya, 5 primer tidak teramplifikasi dalam proses reaksi PCR walau telah dilakukan PCR ulang dengan optimasi

gradien suhu *annealing* (Gambar 1 dan Tabel 2). Primer-primer yang tidak teramplifikasi tersebut adalah Satt 100, Satt 125, Satt 333, Satt 294 dan Satt 224. Dari 15 primer teramplifikasi, terdapat primer Satt 070 yang hasil pitanya tipis (samar), namun masih dapat diskoring pita-pitanya. Hasil pita yang tipis disebabkan proses amplifikasi tidak maksimal sehingga konsentrasi hasil amplifikasinya rendah. Ukuran pita-pita DNA yang dihasilkan berkisar antara 200 – 400 kbp, kecuali primer Satt 633 berada diantara 100 – 200 kbp hal ini menunjukkan bahwa proses PCR berjalan benar (Gambar 1).

Hasil analisis polimorfik terhadap calon tetua persilangan Biosoy 1, Biosoy 2, Demas dan Tanggamus menggunakan 8 primer SSR polimorfik adalah sebagai berikut: 6 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 1 vs Demas yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549 dan Satt 171; 6 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 2 vs Demas yaitu Satt 070, Satt 182, Satt 406, Satt 516, Satt 549 dan Satt 171; 7 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 1 vs Tanggamus yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244; 7 primer SSR dapat membedakan

pasangan Biosoy 2 vs Tanggamus yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549, Satt 171, dan Satt 244 (Tabel 2).

Analisis penentuan pasangan tetua menggunakan 8 primer SSR polimorfik menunjukkan bahwa terdapat lima primer yang dapat membedakan 4 kombinasi pasangan. Lima primer SSR tersebut adalah Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 549 dan Satt 171, yang dapat membedakan Biosoy 1 vs Demas, Biosoy 2 vs Demas, Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Hal tersebut menunjukkan bahwa ke-5 primer SSR tersebut dapat digunakan sebagai marka atau penanda keberhasilan persilangan pada empat kombinasi pasangan calon tetua. Selain itu terdapat tiga primer yang menghasilkan pita spesifik masing-masing pada dua kombinasi pasangan. Tiga primer SSR tersebut adalah Satt 520 yang muncul pada Biosoy 1 vs Demas dan Biosoy 1 vs Tanggamus; Satt 182 pada pasangan Biosoy 2 vs Demas dan Biosoy 2 vs Tanggamus; serta Satt 244 pada pasangan Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Hal tersebut menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan sebagai pembeda yang lebih spesifik dari primer lainnya (Tabel 2).



Gambar 1. Primer SSR monomorfik dan polimorfik (Satt 406) hasil amplifikasi PCR yang dipisahkan menggunakan gel Agarosa 2%.

Tabel 2. Tabel skoring tetua dan analisis kombinasi pasangan dengan primer SSR polimorfik yang teramplifikasi pada reaksi PCR.

No	Nama	Hasil Skoring Calon Tetua				Kombinasi Pasangan			
		Primer SSR	Bio 1	Bio 2	Dms	Tgm	Bio1 vs Dms	Bio2 vs Dms	Bio1 vs Tgm
1	Satt 070	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
2	Satt 144	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
3	Satt 182	0	1	0	0	Mono	Poli	Mono	Poli
		1	0	1	1				
4	Satt 406	0	0	1	1	Poli	Poli	Poli	Poli
		1	1	0	0				
5	Satt 516	0	0	1	1	Poli	Poli	Poli	Poli
		1	1	0	0				
6	Satt 171	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
7	Satt 551	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
8	Satt 244	1	1	1	0	Mono	Mono	Poli	Poli
		0	0	0	1				
9	Satt 633	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
10	Saat 196	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
11	Satt 520	1	0	0	0	Poli	Mono	Poli	Mono
		0	1	1	1				
12	Satt 143	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
13	Satt 549	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
14	Satt 449	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
15	Satt 167	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				

Keterangan: Dms=Demas, Tgm=Tanggamus, Bio=Biosoy

Berdasarkan laju pita DNA pada proses separasi elektroforesis pada primer Satt 406 menunjukkan bahwa pola pita antara tetua jantan (Demas dan Tanggamus) dan tetua betina (Biosoy 1 dan Biosoy 2) berada pada jarak yang paling jauh (sangat polimorfik) sehingga primer tersebut dapat digunakan sebagai marka molekuler dalam persilangan kedelai tersebut.

Pada penelitian ini banyak diperoleh primer-primer SSR yang polimorfik yang menunjukkan bahwa pemilihan primer-primer tersebut sudah sesuai. Menurut Santana *et al.*, (2014) banyak ditemukannya primer SSR polimorfik disebabkan sifat dari primer SSR yang memiliki variabilitas yang tinggi pada genom di tiap lokus, multi alel dan kodominan sehingga cocok digunakan sebagai *marker-assisted selection* (MAS) pada pemuliaan kedelai. Peluang mendapatkan alel

unik dan spesifik dalam suatu koleksi aksesi juga besar (Chaerani *et al.*, 2014) sehingga pemilihan marka SSR ini sudah sesuai untuk studi ini (Lestari *et al.*, 2017).

**Persilangan Kedelai**

Hasil persilangan menunjukkan bahwa, kendala persilangan paling banyak ditentukan oleh gugur bunga yang disusul dengan patah bunga. Bunga yang gugur sangat tinggi mencapai rerata 86% sedangkan bunga patah mencapai lebih 19% (Tabel 3). Gugur bunga yang tinggi hal ini cenderung disebabkan oleh faktor stres ketika proses kastrasi berlangsung, selain itu tangkai bunga merupakan organ penyokong bunga yang masih rapuh, dan merupakan jaringan meristem area pemanjangan dengan ujung meristemnya adalah organ generatif area putik.

Tabel 3. Data persilangan pembentukan populasi 3 macam kombinasi

Nama Persilangan	Jumlah Bunga Kastrasi			Jumlah Polong	
	Disilangkan	Patah (%)	Gugur (%)	Terbentuk (%)	Hampa
Biosoy2/Demas	86	16 (18.6)	72 (83.7)	14 (16.3)	0
Biosoy1/Tanggamus	50	10 (20.0)	44 (88.0)	6 (12.0)	0
Biosoy2/Tanggamus	95	18 (19.0)	83 (87.0)	13 (13.7)	0
Rerata (%)		(19.2)	(86.2)	(14.0)	

Berdasarkan data jumlah polong yang terbentuk di bawah angka 20% dengan rerata 14% pada kisaran antara 12-16.3%. Nilai keberhasilan penyerbukan sangat rendah terhadap bunga yang disilangkan, namun semua polong yang dihasilkan semua bernas dengan nilai kehampaan (0) nol persen (Tabel 3).

Jumlah polong yang terbentuk sangat rendah hal ini diduga disebabkan oleh tingkat gugur bunga yang tinggi mencapai 86%. Gugur bunga yang tinggi tersebut cenderung disebabkan oleh faktor stres ketika proses kastrasi berlangsung, sedangkan patah bunga diduga kuat karena faktor kurangnya kehati-hatian, dan tangkai bunga yang masih rapuh karena merupakan jaringan yang masih muda.

Beberapa faktor yang mempengaruhi kesuksesan penyerbukan dalam pelaksanaan persilangan ditentukan oleh faktor manusia, faktor lingkungan, serta alat yang digunakan (Sitepu *et al.*, 2015). Peran serta manusia dalam mempertinggi kesuksesan persilangan terutama ditentukan oleh keterampilan dan pengetahuan, pengetahuan dalam menentukan kapan waktu yang tepat suatu bunga untuk disilangkan.

Keberhasilan penyerbukan tanaman kedelai dapat dikenali setelah 7 hari melalui inisiasi pembentukan polong. Inisiasi pembentukan polong ditandai dengan munculnya calon polong yang mulai membesar, dan kelopak bunga tetap berwarna hijau. Sebaliknya, jika kelopak bunga menguning dan coklat maka penyerbukan bunga tersebut gagal (Syukur *et al.*, 2015). Pada penelitian ini polong yang terbentuk semua bernas atau tidak ada polong hampa (Tabel 3). Hal ini terjadi karena terbebasnya dari gangguan hama/penyakit terutama hama perusak polong, selain itu, secara genetis bukan merupakan penyerbukan antar kerabat jauh atau persilangan interspesies.

Beberapa aspek yang mempengaruhi keberhasilan penyerbukan buatan dan terjadinya pembuahan ditentukan oleh tingkat kesesuaian genetik (kompatibilitas) tetua, ketepatan waktu reseptif betina dan antesis jantan, kesuburan tanaman serta faktor lingkungan. Faktor lingkungan abiotis yang mungkin sangat

berpengaruh adalah suhu udara dan intensitas cahaya, intensitas cahaya semakin rendah dan suhu udara yang rendah dapat menghambat pemasakan serbuk sari (anther). Sedangkan faktor lingkungan biotis adalah kerusakan bunga dan polong oleh serangan hama atau penyakit (Sitepu *et al.*, 2015).

Keberhasilan penyerbukan buatan dan terjadinya pembuahan ditentukan oleh: a) Kepiawaian menentukan kapan waktu reseptif betina dan antesis jantan, waktu yang baik adalah antara pukul 6 - 10 pagi (Sitepu *et al.*, 2015), b) Viabilitas dan ketersediaan polen (serbuk sari) yang melimpah (Kartono, 2005), c) Manusia terutama terkait dengan keterampilan tenaga penyilang dan ketepatan pemberian perlakuan bunga yang tidak sesuai dapat menyebabkan bunga gugur, d) Faktor lingkungan biotis yaitu adanya serangan hama dan penyakit, e) Kegagalan serbuk sari berkecambah di atas kepala putik meski berada pada kepala putik sendiri dan asing, karena perbedaan masa pemasakan gamet jantan dan betina (Gardner *et al.*, 1991).

Selain kendala-kendala di atas, secara morfologi ukuran bunga kedelai sangat kecil yang ditopang oleh tangkai bunga dengan jaringan yang masih rapuh, sehingga rawan terkena gangguan fisik yang dapat menyebabkan banyaknya bunga yang patah sebelum disilangkan dan menjadi gugur (Tabel 3). Pekerjaan penyerbukan perlu dilakukan dengan sangat hati-hati oleh tenaga teknisi terampil dan berpengalaman. Perlu dilakukan pendekatan metode persilangan yang berbeda untuk dapat mengurangi tingkat kerusakan bunga. Perbaikan metode kastrasi dengan membuka kelopak bunga yang selama ini menggunakan pinset dapat diganti dengan menggunting bagian kelopak bunga, sehingga kerusakan patah tangkai dapat dihindarkan.

Menurut Gardner *et al.* (1991) penyerbukan suatu bunga tidak selalu berhasil membentuk buah dan biji sesuai harapan karena serbuk sari dapat gagal berkecambah pada kepala putiknya sendiri maupun pada kepala putik asing (tidak cocok) walaupun kondisinya sangat menguntungkan dan ketidakcocokan dapat diakibatkan oleh adanya

perbedaan masa pemasakan gamet jantan dan betina.

Keberhasilan presentasi persilangan digolongkan menjadi tiga kriteria yaitu keberhasilan rendah < 20 %, sedang 20-60 % dan tinggi > 60 %. Pada umumnya persentase keberhasilan persilangan kedelai kurang dari 60% (Kartono, 2005). Faktor lingkungan abiotis yang mungkin sangat berpengaruh adalah suhu udara dan intensitas cahaya, intensitas cahaya semakin rendah dan suhu udara yang rendah dapat menghambat pemasakan serbuk sari (anther). Sedangkan faktor lingkungan biotis adalah kerusakan bunga dan polong oleh serangan hama atau penyakit (Sitepu *et al.*, 2015).

Penentuan keberhasilan persilangan dapat diketahui melalui gabungan beberapa karakter morfologi misal warna hipokotil, ukuran daun dan warna bunga yang muncul setelah fase generatif, dan berbagai konsekuensi kehilangan tenaga, waktu, biaya, dan tempat ekstra karena melimpahnya jumlah sampel yang belum pasti. Menurut Lestari *et al.* (2017) dikemukakan bahwa pola polimorfisme tiap primer menunjukkan validitas yang dapat digunakan sebagai dasar analisis konfirmasi penurunan alel progeni F1 dari tetua persilangannya. Hal tersebut mendorong bahwa, untuk merujuk kebenaran hasil persilangan secara singkat, cepat dan akurat dan dapat dilakukan pada fase bibit, maka perlu dilakukan konfirmasi hasil persilangan secara molekuler.

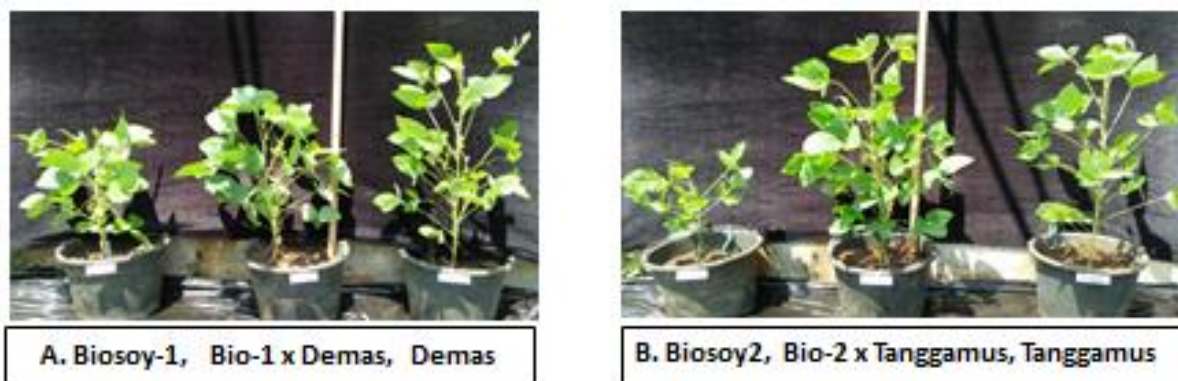
### Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

Kegiatan persilangan dari kombinasi empat tetua, diperoleh 18 nomor turunan terduga hasil persilangan F1 yaitu 8 nomor dari persilangan Biosoy 2 x Demas, 2 nomor dari persilangan Biosoy 1 x Tanggamus, dan 8 nomor dari persilangan Biosoy 2 x Tanggamus. Karakter morfologi yang diamati pada tanaman terduga hibrida F1 adalah tinggi tanaman, umur berbunga, warna hipokotil dan warna bunga. Dua karakter tinggi tanaman dan umur berbunga diketahui sebagai karakter kuantitatif yang ekspresinya dikontrol oleh banyak gen yang dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga informasinya bersifat bias dan kurang akurat. Dilaporkan bahwa, karakter tinggi tanaman terkait kuat dengan beberapa karakter umur berbunga, jumlah bukapada batang utama, jumlah polong, umur masak, dan bobot biji per tanaman (Putri *et al.*, 2014).

Karakter tinggi tanaman terduga turunan persilangan F1 dari 3 populasi persilangan cenderung sedikit lebih tinggi dari tetua Biosoy 1 dan Biosoy 2, dan lebih pendek dari tetua Demas dan Tanggamus, namun karakter umur berbunga cenderung sama dengan tetua Biosoy 1 dan Biosoy 2, dan lebih pendek dari tetua Demas dan Tanggamus (Tabel 4). Berdasarkan morfologi tinggi tanaman dari 18 nomor tanaman terduga turunan persilangan asal 3 kombinasi persilangan, terdapat dua nomor yang diduga sebagai tanaman hibrida F1 yaitu nomor I.3 dari persilangan Biosoy 2 x Demas dan nomor III.5 asal persilangan Biosoy 2 x Tanggamus (Tabel 4).

Tabel 4. Konfirmasi fenotipik hasil persilangan berdasarkan morfologi tinggi tanaman, umur berbunga, warna hipokotil dan warna bunga.

	Nama Tetua Nomor Pogeni	Tinggi Tanaman	Umur Berbunga	Warna Hipokotil	Warna Bunga	Keterangan Status Hibrida
1	Biosoy2xDemas (No.1-6)	41.33	32	Ungu	Ungu	5 Tak terduga
	Biosoy2xDemas No.3	46	32	Ungu	Ungu	1Terduga hibrida
	Biosoy2	42	33	Ungu	Ungu	
	Demas	67	36	Ungu	Ungu	
2	Biosoy1xTanggamus (No.1-2)	42	32	Hijau	Putih	2 <i>Selfing</i>
	Biosoy1	41	33	Hijau	Putih	
	Tanggamus	65	37	Ungu	Ungu	
3	Biosoy2xTanggamus (No.1-8)	42.5	32.5	Ungu	Ungu	7 Takterduga
	Biosoy2xTanggamus No.5	51	33	Ungu	Ungu	1Terduga hibrida
	Biosoy2	42	33	Ungu	Ungu	
	Tanggamus	65	37	Ungu	Ungu	



Gambar 2. A-B. Figur tetua persilangan yang mengagip tanaman terduga F1 hasil persilangan.

Uji kebenaran hasil penyerbukan silang secara konvensional dilakukan dengan cara menanam biji-biji hasil *crossing* dengan kedua tetua dan membandingkannya karakter-karakter morfologi, sedangkan karakter morfologi sangat terbatas dan dipengaruhi oleh lingkungan. Karakter morfologi dengan tanda beda yang muncul setelah fase pertumbuhan generatif misal warna bunga, hal ini sangat merugikan dari pertimbangan waktu, tempat, tenaga dan biaya, selain itu juga tidak akurat. Penentuan kebenaran persilangan kedelai melalui warna bunga sangat terbatas, karena karakter warna bunga kedelai bersifat dominan ungu dan resesif putih. Sehingga persilangan antara 2 (dua) tetua yang memiliki karakter warna bunga yang sama sulit dijadikan sebagai parameter atau penanda morfologi.

Kedelai merupakan tanaman kleistogami yaitu tanaman yang menyerbuk sendiri sebelum mahkota bunga mekar. Hal ini merupakan kendala tersendiri bagi para pemulia kedelai untuk memastikan kebenaran polong dan biji-biji yang dihasilkan dalam kegiatan pembentukan populasi persilangan tersebut. Apakah polong dan biji-biji yang terbentuk sesuai target yang dikehendaki atau hasil penyerbukan sendiri. Kendala tersebut akan dijumpai baik dalam pembentukan populasi persilangan pada generasi awal (generasi pertama) maupun pada program silang balik (*backcrossing*) pada pemuliaan percepatan perbaikan varietas dengan penyisipan gen-gen unggul yang dikehendaki.

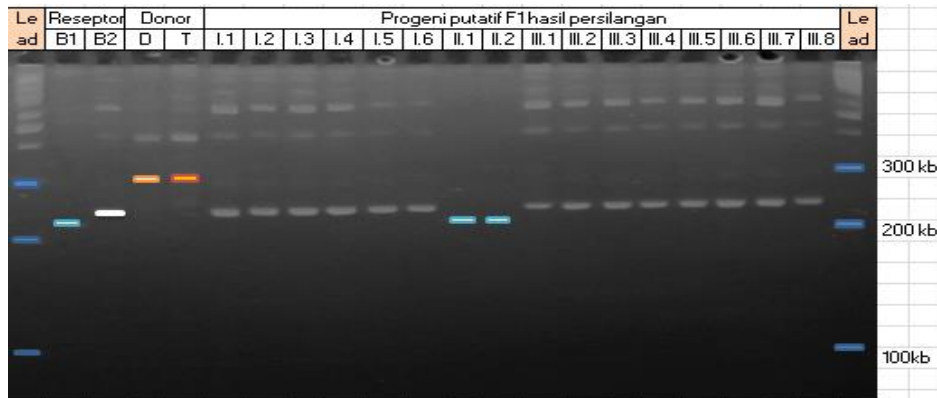
Konfirmasi secara fenotipik dengan tinggi tanaman dan umur berbunga belum memadai untuk menentukan individu F1 hasil persilangan, perlu didukung dengan karakter warna hipokotil dan warna bunga. Karakter warna hipokotil dan warna bunga diketahui bersifat dominan yaitu

warna ungu pada bunga dominan terhadap warna putih, demikian juga warna hipokotil ungu dominan terhadap warna hijau. Karena keterbatasan dua karakter ini sehingga sulit bagi pemulia untuk menggunakan sebagai penciri keberhasilan persilangan, terutama jika kedua tetua persilangan sama-sama memiliki penciri warna yang sama.

#### Konfirmasi Secara Molekuler

Sejak berkembangnya seleksi berbasis marka molekuler, seleksi molekuler memiliki keunggulan-keunggulan yaitu dapat mencapai sasaran target secara akurat, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, tidak merusak karena hanya memerlukan bagian kecil dari tanaman dan dapat dilakukan pada fase bibit (Reflinur & Lestari, 2015; Santoso *et al.*, 2006). Kesuksesan hibridisasi dapat diketahui oleh munculnya alel-alel yang terbawa hasil introgresi dari kedua tetuanya sehingga generasi keturunannya tersebut terkonfirmasi sebagai tanaman hibrida (Rosalia *et al.*, 2020).

Berdasarkan pola pita DNA (alel) yang terbentuk pada gel poliakrilamid menggunakan marka polimorfik primer SSR Satt 406 diketahui bahwa calon-calon tetua betina antara varietas Biosoy 1 dengan Biosoy 2 memiliki pola pita DNA (alel) yang berbeda ukuran. Pola pita varietas Biosoy 1 diperkirakan memiliki ukuran 225 kb sedangkan varietas Biosoy 2 diperkirakan memiliki ukuran 250 kb sehingga laju pita DNA Biosoy 1 lebih cepat. Namun, pada tetua jantan varietas Demas dan Tanggamus memiliki pola pita yang sama diperkirakan berukuran 300 kb, dan tampak jauh berada di atas pola pita calon-calon tetua betina (Gambar 3).



Gambar 3. Konfirmasi molekuler pada tiga macam populasi persilangan menggunakan primer SSR polimorfik Satt 406 pada gel poliakrilamid 8%.  
(Ket. B1: Biosoy1, B2: Biosoy2, D: Demas, T: Tanggamus, I.1-6 Biosoy2/Demas, II.1-2 Biosoy1/Tanggamus, III.1-8 Biosoy2/Tanggamus).

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa, posisi pola pita yang sama pada kedua calon tetua jantan, kedua tetua tersebut telah diketahui memiliki karakter toleran Al. Alel-alel tersebut dimungkinkan memiliki banyak kesamaan pada basa penyusunnya, namun hal tersebut perlu dibuktikan melalui sekuensing.

Berdasarkan konfirmasi marka molekuler polimorfik menggunakan Satt 406 pada tiga kombinasi persilangan menunjukkan bahwa alel tetua jantan dari varietas Demas dan Tanggamus tidak muncul pada turunan F1 putatif dari tiga kombinasi persilangan. Hal tersebut ditunjukkan (Gambar 3) bahwa pada persilangan Biosoy 1 x Tanggamus, alel tetua Biosoy 1 berada pada ukuran 225 kb muncul pada individu Biosoy 1 dan individu-individu turunan F1 putatif, namun alel tetua Tanggamus tidak muncul pada individu-individu turunan F1 putatif. Demikian juga pada kombinasi persilangan antara varietas Biosoy 2 x Demas dan Biosoy 2 x Tanggamus, alel tetua Biosoy 2 sebesar 250 kb muncul pada individu Biosoy 2 dan individu-individu turunan F1 putatif, namun alel tetua Demas dan Tanggamus tidak muncul pada individu-individu turunan F1 putatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa posisi alel Demas dan Tanggamus sebesar 300 kb tidak terinsersikan pada kombinasi persilangan tersebut. Hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan konsep bahwa dalam penyerbukan silang merupakan hasil dari peleburan 2 sel gamet betina dan jantan yang masing-masing menyumbang 1 set kromosom, sehingga individu yang dihasilkan merupakan genotipe heterozigot dengan perbandingan genetik 1:1. Hal tersebut di atas menunjukkan bahwa populasi persilangan generasi F1 belum berhasil didapatkan.

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa penggunaan marka molekuler dapat berperan penting membantu pemulia dalam mengkonfirmasi kebenaran populasi persilangan, apakah populasi tersebut merupakan hasil dari penyerbukan silang (*crossing*) atau hasil penyerbukan sendiri (*selfing*). Hasil analisis SSR ini terbukti secara cepat dan efektif dapat menskrining generasi hibrida hasil *crossing* tanpa harus didahului seleksi morfologi di lapang yang memerlukan waktu lama, sesuai dengan laporan sebelumnya (Khan *et al.*, 2013; Lestari *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2011).

### KESIMPULAN

Sejumlah 8 primer SSR polimorfik dapat membedakan kombinasi 4 pasang tetua kedelai yaitu: 6 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549 dan Satt 171) untuk Biosoy 1 x Demas; 6 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549 dan Satt 171) untuk Biosoy 2 x Demas; 7 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244) untuk Biosoy 1 x Tanggamus; serta 7 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244) untuk Biosoy 2 x Tanggamus. Sebanyak 18 nomor individu F1 putatif dari 3 kombinasi persilangan yaitu 8 Biosoy 2 x Demas, 2 Biosoy 1 x Tanggamus dan 8 Biosoy 2 x Tanggamus telah dikonfirmasi secara molekuler menggunakan primer SSR polimorfik Satt 406 dengan hasil bahwa alel-alel tetua jantan tidak terkandung (terinsersikan) pada ke-18 individu F1 putatif tersebut, dengan demikian individu tersebut merupakan hasil penyerbukan sendiri (*selfing*). Penggunaan alat bantu seleksi molekuler dengan

primer SSR Satt 406 dapat membantu pemulia dalam menskrining populasi heterozigot pada generasi awal terhadap tanaman kedelai secara efektif dan akurat, skrining secara molekuler juga bersifat melengkapi dari kekurangan penggunaan penciri morfologi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dan Bapak Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian atas dukungan pendanaan pada penelitian ini, yang merupakan bagian dari penelitian ROPP TA. 2019-2021 berjudul Perbaikan Varietas Kedelai Biosoy untuk Karakter Toleransi Terhadap Cekaman Al.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ashari. (2003). Tinjauan tentang alih fungsi lahan sawah ke non sawah dan dampaknya di Pulau Jawa. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, 21(2), 83–98.
- Balitkabi. (2016). *Deskripsi varietas unggul kedelai 1918-2016*.
- BPS. (2021). Impor kedelai menurut negara asal utama tahun 2010-2020.
- Carsono, N., Prayoga, G. I., Rostini, N., & Dono, D. (2016). Seleksi berbasis marka molekuler pada padi generasi F2 guna merakit galur padi harapan tahan wereng coklat. *Jurnal Agrikultura*, 27(1), 9–15.
- Chaerani, Hidayatun, N., & Utami, D. W. (2011). Keragaman genetik 50 aksesi plasma nutfah kedelai berdasarkan sepuluh penanda mikrosatelit. *Jurnal AgroBiogen*, 7(2), 96–105.
- Chaerani, Utami, D. W., Hidayatun, N., Abdullah, B., & Suprihatno, B. (2014). Asosiasi antara marka SSR dengan ketahanan terhadap wereng batang coklat pada varietas dan calon galur harapan padi. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 11(1), 43–52.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Eka, A., Hanafiah, D. S., & Nuriadi, I. (2015). Respon morfologis dan fisiologis beberapa varietas kedelai (*Glycine max. L. Merrill*) di tanah masam. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(2), 507–514.
- Gardner, F. P., Pearce, R. B., & Michell, R. L. (1991). *Fisiologi tanaman budidaya*. Jakarta: Indonesia University Press.
- Giono, B. R. W., Muh. Farid, B. D. R., Nur, A., Solle, M. S., & Idrus, I. (2014). Ketahanan genotipe kedelai terhadap kekeringan dan kemasaman, hasil induksi mutasi dengan sinar gamma. *Jurnal Agroteknos*, 4(1), 44–52.
- Kartono. (2005). Persilangan buatan pada empat varietas kedelai. *Buletin Teknik Pertanian*, 10(2), 49–52.
- Kementan. (2020). *Info Teknologi: Demas 2 dan Demas 3, pilihan kedelai untuk lahan masam*.
- Khan, T. D., Anh, T. Q., Buu, B. C., & Xuan, T. D. (2013). Applying molecular breeding to improve soybean rust resistance in Vietnamese elite soybean. *American Journal Plant Science*, 4, 1–6.
- Krisnawati, A. (2017). Kedelai sebagai sumber pangan fungsional (Soybean as source of functional food). *Iptek Tanaman Pangan*, 12(1), 57–65.
- Lestari, P., Sustiprijatno, & Asadi. (2017). Konfirmasi penurunan alel tetua persilangan kedelai pada generasi F1 berdasarkan marka SSR. *Prosiding Seminar Nasional III Tahun 2017*, 1–6.
- Mulyani, A., & Sarwani, M. (2013). Karakteristik dan potensi lahan sub optimal untuk pengembangan pertanian di Indonesia. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 7(1), 47–55.
- Nuraida, D. (2012). Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *eJurnal El-Hidayah*, 2(2), 97–103.
- Pardal, S. J., & Suharsono. (2016). Evaluation of transgenic soybean lines tolerant to Aluminium in biosafety containment. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 35(2), 155–161.
- Putri, P. P., Adisyahputra, & Asadi. (2014). Keragaman karakter morfologi, komponen hasil, dan hasil plasma nutfah kedelai (*Glycine max L.*). *BIOMA*, X(2), 41–48.
- Reflinur, & Lestari, P. (2015). Penentuan gen dalam kromosom tanaman dengan bantuan marka DNA. *Jurnal Litbang Pertanian*, 34(4), 177–186.

- Risliawati, A., Riyanti, E. I., Lestari, P., Utami, D. W., & Silitonga, T. S. (2015). Development of SSR marker set to identify fourty two Indonesian soybean varieties. *Jurnal AgroBiogen*, 11(2), 49–58.
- Rosalia, D., Lestari, P., Soegianto, A., Saptadi, D., Sutanto, A., Nugroho, K., ... Roostika, I. (2020). Konfirmasi pewarisan alel pada generasi F1 hasil persilangan Calcutta-4 (*Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*) dan *Musa acuminata* ssp. *microcarpa* berdasarkan marka. *Jurnal AgroBiogen*, 16(1), 17–24.
- Santana, F. A., da Silva, M. F., Guimares, J. K. F., Ferreira, M. F. S., Perreira, W. D., Piovesan, N. D., & de Barros, E. G. (2014). Marker-assisted selection strategies for developing resistant soybean plants to cyst nematode. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(13), 180–186.
- Santoso, T. J., Utami, D. W., & Septiningsih, E. M. (2006). Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal AgroBiogen*, 2(1), 1–7.
- Sitepu, M. B., Rosmayati, & Bangun, M. K. (2015). Persilangan genotipe-genotipe kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) hasil seleksi pada tanah salin dengan tetua betina varietas Anjasmoro. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(1), 257–263.
- Sudrajat, D. (2010). Identifikasi karakter morfofisiologi kedelai adaptif lahan masam. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 10(2), 103–110.
- Syukur, M., Sujiprihati, S., & Yuniati, R. (2015). *Teknik pemuliaan tanaman (edisi revisi)*. Jakarta.
- Tasma, I. M. (2015). Gen dan QTL pengendali toleransi tanaman terhadap keracunan Aluminium dan aplikasinya untuk pemuliaan tanaman di Indonesia. *Jurnal AgroBiogen*, 11(3), 111–124.
- Tasma, I. M., Warsun, A., & Asadi. (2015). Development and characterization of F2 population for molecular mapping of Aluminum-toxicity tolerant QTL in soybean. *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), 1–8.
- Terryana, R. T., Nugroho, K., Reflinur, Mulya, K., Dewi, N., & Lestari, P. (2017). Keragaman genotipik dan fenotipik 48 aksesori kedelai introduksi asal Cina. *Jurnal AgroBiogen*, 13(1), 1–16.
- Wu, X., Vuong, T. D., Leroy, J. A., Shannon, J. G., Sleper, D. A., & Nguyen, H. T. (2011). Selection of a core set of RILs from Forrest X William 82 to develop a framework map in soybean. *Theory Applied Genetics*, 122(6), 1179–1187.