

Jurnal
**TANAMAN INDUSTRI
DAN PENYEGAR**
Journal of Industrial and Beverage Crops
Volume 4, Nomor 1, Maret 2017

**ANALISIS KERAGAMAN GENETIK 28 NOMOR KOLEKSI KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) BERDASARKAN MARKA SSR**

**GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF 28 CACAO COLLECTIONS (*Theobroma cacao* L.)
BASED ON SSR MARKERS**

Ilham Nur Ardhi Wicaksono¹⁾, Rubiyo²⁾, Dewi Sukma³⁾, dan *Sudarsono³⁾

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar¹⁾

Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

ilham.ardhi80@gmail.com

Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian²⁾

Jalan Tentara Pelajar No 10. Bogor 16114 Indonesia

rubio_rb@yahoo.co.id

Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor³⁾

Jalan Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

**s_sudarsono@ymail.com*

(Tanggal diterima: 18 Januari 2017, direvisi: 14 Februari 2017, disetujui terbit: 30 Maret 2017)

ABSTRAK

Analisis keragaman genetik koleksi plasma nutfah kakao menggunakan marka molekuler mempunyai peranan penting dalam program perakitan klon unggul baru. Ketersediaan klon komersial dan klon unggul lokal meningkatkan peluang keberhasilan perakitan klon unggul baru sehingga analisis keragaman genetik materi tersebut perlu dilakukan. Tujuan penelitian adalah menganalisis keragaman genetik 28 nomor koleksi kakao berdasarkan marka SSR yang berguna dalam pemilihan tetua persilangan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balitri), Sukabumi, dan Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman (PMB), Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, mulai bulan November 2015 sampai Mei 2016. Analisis keragaman genetik dilakukan pada 28 klon kakao yang terdiri dari 13 klon unggul lokal dan 15 klon komersial. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan prosedur berbasis CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*). Selanjutnya, DNA diamplifikasi dengan teknik PCR (*polymerase chain reaction*) menggunakan 20 pasang primer SSR (*simple sequence repeats*). Hasil penelitian menunjukkan semua marka SSR yang digunakan bersifat polimorfik dengan rata-rata nilai PIC (*polymorphism information content*) cukup tinggi, yaitu 57%. Pohon filogenetik yang dianalisis menggunakan program DARwin (*Dissimilarity Analysis and Representation for Windows*) versi 6.05 terbagi menjadi 3 kelompok besar yang menempatkan klon unggul lokal dan klon komersial bersama-sama dalam tiap-tiap kelompok. Klon unggul lokal diduga mempunyai asal usul yang dekat dengan klon komersial yang sudah dibudidayakan di Indonesia. Selain itu, beberapa klon kakao berpotensi menjadi tetua persilangan karena mempunyai jarak genetik cukup jauh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa marka SSR merupakan alat bantu cukup potensial untuk menentukan tetua persilangan yang diharapkan dapat meningkatkan peluang heterosis pada keturunannya.

Kata kunci: Kakao, keragaman genetik, marka SSR, klon unggul lokal, klon komersial

ABSTRACT

Analysis of genetic diversity of cacao germplasm collections using molecular markers has an important role in the assembly of new superior clones. The availability of commercial and superior local clones could increase the success of new superior clones' assembly. Hence, the genetic diversity analysis of these materials needs to be done. The study was aimed to analyze genetic diversity of 28 cacao collections based on SSR markers that would be useful for selection of parental lines. The research was conducted in the Integrated Laboratory, Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute, Sukabumi, and Plant Molecular Biology laboratory, Bogor Agricultural University, from November 2015 to May 2016. Analysis of genetic diversity was conducted using 28 cacao clones (13 superior local clones and 15 commercial clones). DNA was extraction using CTAB method, which then amplified by PCR technique using 20 SSR primers. The result showed that all SSR markers used in this study were polymorphic with an average value of PIC was high (57%). Phylogenetic tree constructed using DARwin program version 6.05 is divided into 3 major groups, which placed commercial and superior local clones together in each group. Superior local clones observed herein might have close relationships with commercial clones that have long been cultivated in Indonesia. Furthermore, some cacao clones could potentially be parental lines because they had high genetic distance. The results showed that SSR markers are powerful tools to determine potential parental lines, which is expected to increase the chances of heterosis in their progenies.

Keywords: Cacao, genetic diversity, SSR markers, superior local clones, commercial clones

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas tanaman perkebunan yang mempunyai peranan penting dalam perekonomian Indonesia. Tetapi, rata-rata produktivitas biji kering kakao Indonesia saat ini hanya sekitar 750 kg/hektar/tahun, jauh lebih rendah dibandingkan dengan potensinya yang mencapai lebih dari 2 ton/hektar/tahun (Rubiyo, 2013). Hal tersebut salah satunya disebabkan oleh serangan organisme pengganggu tanaman (OPT), mutu benih yang rendah, dan penerapan teknik budi daya anjuran yang belum optimal (Susilo, 2007). Ancaman ke depan dalam pengembangan tanaman kakao adalah perubahan iklim global yang memicu kenaikan suhu, perubahan pola curah hujan, hingga kekeringan. Pemulia tanaman ditantang untuk merakit varietas unggul baru yang lebih adaptif terhadap perubahan iklim.

Pemuliaan tanaman kakao, saat ini dan di masa mendatang, selain merakit varietas unggul baru yang memiliki sifat daya hasil dan mutu tinggi, juga tahan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Perakitan varietas unggul kakao mempunyai beberapa tahapan, yaitu (1) pengumpulan materi genetik atau plasma nutfah melalui eksplorasi maupun introduksi, (2) evaluasi materi genetik, dan (3) pemanfaatan materi genetik melalui proses seleksi, hibridisasi, mutasi, dan rekayasa genetik. Hibridisasi adalah proses persilangan yang dilakukan untuk menggabungkan beberapa karakter yang diharapkan. Keberhasilan suatu persilangan ditentukan oleh jarak genetik tetua yang digunakan, yaitu semakin jauh jarak genetik akan semakin meningkatkan peluang terjadinya heterosis pada progeni yang dihasilkan (Rubiyo, 2013). Berkaitan dengan hal tersebut maka diperlukan informasi akurat tentang keragaman genetik plasma nutfah kakao yang akan dipilih sebagai tetua.

Analisis keragaman genetik tanaman dapat dilakukan berdasarkan karakter morfologi maupun marka molekuler. Penggunaan marka molekuler memiliki beberapa keuntungan dalam membantu program pemuliaan, antara lain untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan genotipe, memilih kombinasi tetua persilangan terbaik, serta untuk mengkonfirmasi keunggulan suatu genotipe dengan lebih cepat dan akurat karena ekspresinya tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan umur tanaman (Susilo, 2007; Izzah, 2014). Selain itu, marka molekuler juga dapat dimanfaatkan untuk proses seleksi yang dilakukan hanya berdasarkan sifat genetik tanaman sehingga kegiatan pemuliaan tanaman dapat menjadi lebih tepat, cepat, dan efisien (Azrai, 2005).

Salah satu marka molekuler yang sering digunakan untuk analisis keragaman genetik adalah mikrosatelit atau SSR (*simple sequence repeat*), yaitu sekuen DNA dengan panjang sampai 6 pasangan basa yang diulang secara berurutan (Thiel, Michalek, Varshney, & Graner, 2003). Marka SSR sering digunakan dalam analisis genetik karena mempunyai beberapa keunggulan, yaitu menghasilkan banyak alel, mempunyai reproduktivitas dan variabilitas tinggi, bersifat kodominan, jumlahnya relatif melimpah di sepanjang genom, mempunyai tingkat polimorfisme yang tergolong tinggi, dapat diidentifikasi dengan metode PCR (*polymerase chain reaction*), terdapat pada lokasi kromosom yang spesifik, dan dapat diaplikasikan menggunakan metode *genotyping* yang canggih (Parida, Yadava, & Mohapatra, 2010; Kalia, Rai, Kalia, Singh, & Dhawan, 2011).

Analisis keragaman genetik kakao dengan menggunakan marka SSR sebelumnya telah dilakukan oleh Zhang, Mischke, Johnson, Phillips-Mora, & Meinhardt (2009), Kurniasih, Rubiyo, Setiawan, Purwantara, & Sudarsono (2011), dan Rubiyo, Izzah,

Sulistiyorini, & Tresniawati (2015). Kurniasih *et al.* (2011) berhasil mengelompokkan 29 genotipe kakao koleksi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia menjadi tiga grup berdasarkan 24 marka SSR polimorfik. Di lain pihak, penelitian yang dilakukan oleh Rubiyo *et al.* (2015) menggunakan 14 marka SSR polimorfik berhasil mengelompokkan 12 klon kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara menjadi 3 kelompok. Selain itu, juga dihasilkan 7 kombinasi persilangan dengan nilai jarak genetik > 80%.

Materi genetik berupa klon-klon unggul lokal maupun komersial yang tersebar di beberapa daerah sangat potensial untuk dimanfaatkan dalam program perakitan varietas unggul baru. Penelitian ini bertujuan menganalisis keragaman genetik 28 nomor koleksi kakao berdasarkan marka molekuler SSR. Hasil

penelitian diharapkan dapat dijadikan sebagai acuan dalam pemilihan tetua persilangan kakao dalam upaya mendapatkan keturunan dengan sifat-sifat yang lebih unggul dibandingkan dengan tetuanya. Di samping itu juga dapat mendukung program perakitan varietas unggul baru kakao secara lebih efektif dan efisien.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) dan Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman (PMB), Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, mulai bulan November 2015 sampai Mei 2016.

Tabel 1. Klon kakao yang digunakan dalam penelitian
Table 1. List of cacao clones used in the study

No	Nama klon	Tipe kakao	Karakter unggul*	Lokasi pengambilan sampel
1.	KT 1	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Banyuwangi, Jawa Timur
2.	KT 4	Lindak	Produksi 1,7 ton/ha	Banyuwangi, Jawa Timur
3.	KT 3	Lindak	Produksi 1,7 ton/ha	Banyuwangi, Jawa Timur
4.	Theca 1	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Pesawaran, Lampung
5.	Theca 2	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Pesawaran, Lampung
6.	Theca 3	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Pesawaran, Lampung
7.	Theca 4	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Pesawaran, Lampung
8.	Theca 6	Lindak	Produksi 2 ton/ha	Pesawaran, Lampung
9.	IAARD 1	Lindak	Potensi 1,5 ton/ha, tahan BBK	Sulawesi Tenggara
10.	IAARD 2	Lindak	Potensi 1,5 ton/ha, tahan BBK	Sulawesi Tenggara
11.	IAARD 4	Lindak	Potensi 1,7 ton/ha, moderat BBK	Sulawesi Tenggara
12.	IAARD 6	Lindak	Potensi 2 ton/ha moderat BBK	Sulawesi Tenggara
13.	IAARD 9	Lindak	Potensi 2 ton/ha moderat BBK	Sulawesi Tenggara
14.	ICS 13	Lindak	Produksi 1,8 ton/ha	KP Pakuwon, Sukabumi
15.	GC 7	Lindak	Produksi 2 ton/ha	KP Pakuwon, Sukabumi
16.	Sulawesi 1	Lindak	Produksi 1,8–2,5 ton/ha, tahan VSD	KP Pakuwon, Sukabumi
17.	Sulawesi 2	Lindak	Produksi 1,8–2,75 ton/ha, tahan BBK	KP Pakuwon, Sukabumi
18.	DRC 16	Edel	Produksi 1,5 ton/ha, tahan VSD	KP Pakuwon, Sukabumi
19.	TSH 858	Lindak	Produksi 1,7 ton/ha	KP Pakuwon, Sukabumi
20.	ICCRI 3	Lindak	Produksi 2 ton/ha, moderat VSD & PBK	Banyuwangi, Jawa Timur
21.	ICS 60	Lindak	Produksi 1,5 ton/ha, moderat VSD	KP Pakuwon, Sukabumi
22.	DR 38	Edel	Produksi 1,5 ton/ha	KP Pakuwon, Sukabumi
23.	Sca 6	Lindak	Produksi 1,5 ton/ha, tahan VSD & BBK	KP Pakuwon, Sukabumi
24.	Sca 12	Lindak	Produksi 1,5 ton/ha, tahan VSD & BBK	Banyuwangi, Jawa Timur
25.	NIC 7	Lindak	Produksi 1,6 ton/ha, moderat BBK	KP Pakuwon, Sukabumi
26.	MCC 01	Lindak	Produksi 3,6 ton/ha, tahan VSD & BBK	KP Pakuwon, Sukabumi
27.	MCC 02	Lindak	Produksi 3,1 ton/ha, tahan VSD & BBK	KP Pakuwon, Sukabumi
28.	RCC 73	Lindak	Produksi 2,7 ton/ha, moderat VSD & BBK	KP Pakuwon, Sukabumi

Keterangan : * Data diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (tidak dipublikasi) dan SK Pelepasan Varietas Unggul Kakao

Notes : * Data were obtained from Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute (unpublished) and the Decree of new released cacao varieties

Tabel 2. Identitas marka mikrosatelit (SSR) yang digunakan dalam penelitian
Table 2. Microsatellite markers (SSR) identities used in the study

Nama primer	LG	Primer (5'-3')	Jumlah basa	Ukuran alel	Motif pengulangan	Tm (°C)
mTcCIR144	1	F: AACCACTGACACGCAATGAA	20	242	(CT)2TTT(CT)9	55,1
		R: TGTTTGCAAATAAAGAAGAGAGGA	24			52,7
mTcCIR184	1	F: ACTGCTGCAGCCTCTCTTTC	20	204	(CA)8(CT)13	57,6
		R: ACATGGAGGGAGGGAGAGAT	20			57,1
mTcCIR162	2	F: GACCTTTTCCCTGATTC	20	250	(GA)19	53,3
		R: TGGCAAAAATTCACCACTCA	20			52,9
mTcCIR281	2	F: CCGCTGTTTTGGTATTTTC	18	194	(TC)12(CA)14	49,0
		R: GGATGAGGGGTGGTTG	16			52,4
mTcCIR82	3	F: GCAATCATGTGCCCTTCTA	20	206	(AG)6AA (AG)7	55,2
		R: AAGCTTATTGCGGAAGGACA	20			54,5
mTcCIR81	3	F: TGAAGCTCCCACTACTACTGA	20	216	(GA)10	49,9
		R: ACAATCTGTCCATTATCTG	20			47,3
mTcCIR76	4	F: GAAAATGGGGGTCTTTTGGT	20	196	(CT)9	53,3
		R: AGGCGAAGAGGGAGAAGAAG	20			56,3
mTcCIR213	4	F: GATCTCGCAAACTAACA	18	261	(CT)26	47,1
		R: TAAGTAAAATGAAGGTGTGA	20			46,3
mTcCIR69	5	F: GGACATCGGTGTTCCATCAG	20	208	(CT)20	55,6
		R: TGCTATGAGATTGAAAGAGAATTGA	25			52,4
mTcCIR109	5	F: CCCGTAAGCTTCCATTTCC	20	221	(CT)12	53,9
		R: CAAAGGGACCAAAAAGAGCA	20			53,4
mTcCIR255	6	F: GCCTTACAGCATTCCCATGA	20	193	(AC)11	55,2
		R: ATCTGCAGGACTTGGACCAC	20			57,1
mTcCIR291	6	F: TTGCAATTGTCCCAAGCATA	20	212	(CT)12	52,8
		R: ATGTCAAGCATGGCAGTGTT	20			55,3
mTcCIR190	7	F: CTGAAGCACAATTATCCATCAA	23	172	(TG)12	53,7
		R: CCAATTGCTCCACAAAAGAGC	20			59,1
mTcCIR141	7	F: TGTTGCATAAAAACAGGTTTC	21	217	(TC)14	51,6
		R: CCTAAAATCCTTCCTAACAGC	21			50,8
mTcCIR211	8	F: GGGATTGCACCTTACAAGGT	20	179	(CT)9	55,6
		R: TCCAAGTTCCGTATGTGCTG	20			54,9
mTcCIR103	8	F: GAGAGATGGCTTAAGGAT	18	112	(GA)10	48,0
		R: ACCATACTATTGAAACATTG	20			45,3
mTcCIR251	9	F: TCATGCCCAGTGACACAAAT	20	228	(CT)7(CA)12	54,8
		R: AATGGACTGGAGCATGGAAG	20			54,9
mTcCIR145	9	F: CAGACTTCCAACCTCAAACT	20	117	(CT)17	50,2
		R: TGAGAATAGATGGACCGAT	19			49,7
mTcCIR155	10	F: CTTAGAGGCTTGTGCCGTGA	20	197	(TC)12	57,2
		R: GCCATGCCAATTTCCAATAA	20			51,7
mTcCIR209	10	F: TGTCTTCACATAAGCCATGA	21	243	(GT)6AT(GA)9	53,8
		R: TGTTGCCCTTCCTTGTTAGG	20			55,0

Keterangan : LG (grup keterpautan) merupakan urutan posisi sejumlah lokus dalam kromosom

Notes : LG (linkage group) is the position of a number of loci on chromosomes

Materi Tanaman

Bahan genetik kakao yang dianalisis sebanyak 28 klon, terbagi menjadi 2 kelompok besar. Kelompok pertama adalah 13 klon unggul lokal hasil observasi di beberapa sentra produksi kakao, sedangkan kelompok kedua adalah 15 klon komersial yang telah dibudidayakan secara luas oleh petani (Tabel 1). Klon unggul lokal berasal dari persilangan buatan yang dilakukan oleh petani setempat dan ada juga yang berasal dari biji hasil persilangan alami yang setelah ditanam ternyata mempunyai keunggulan dalam hal produktivitas. Klon komersial merupakan hasil dari program pemuliaan kakao secara konvensional yang

telah dilepas oleh pemerintah sebagai klon unggul nasional.

Ekstraksi DNA Kakao

Ekstraksi DNA menggunakan prosedur ekstraksi berbasis CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) mengikuti metode Allen, Vergara, Krasynanski, Kumar, & Thompson (2006) dan Santos *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Sampel daun muda segar dari 28 klon kakao ditimbang sebanyak 0,3 g, lalu ditambahkan buffer ekstraksi CTAB, PVP, dan *mercapto etanol*, kemudian dihaluskan menggunakan alat mortar dan *pestle*. Dalam proses ekstraksi ditambahkan RNase yang berfungsi untuk mendegradasikan RNA. Pellet

DNA hasil ekstraksi selanjutnya dikeringanginkan. Setelah kering ditambahkan 200 μ l TE buffer dan dibiarkan selama setengah hari untuk melarutkan benang-benang DNA.

Penentuan Kuantitas dan Kualitas DNA

DNA hasil isolasi selanjutnya diuji kualitas dan kuantitasnya menggunakan elektroforesis gel agarose 1% dan *Thermo Scientific NanoDrop 2000* spektrofotometer untuk melihat konsentrasi dan kemurniannya. Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan protein diukur pada panjang gelombang 280 nm. Batas kemurnian yang diterima dalam analisis molekuler pada rasio A260/A280 adalah 1,8–2,0.

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR

Template DNA dari masing-masing klon kakao diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan 20 primer SSR yang telah dikembangkan oleh Lanaud *et al.* (1999) dan Kurniasih *et al.* (2011) yang mendesain ulang urutan nukleotidanya berdasarkan program primer 3 (Tabel 2). PCR dilakukan dengan total volume 15 μ l, terdiri atas 2 μ l *DNA template*, 0,3 μ l *primer mix* (konsentrasi 10 pmol), 7,5 μ l *PCR mix*, dan ditambahkan 5,2 μ l *ultra purewater* (ddH₂O).

Proses PCR dilakukan dalam 35 siklus, diawali pra-denaturasi (95°C; 3 menit), kemudian tahap amplifikasi yang terdiri dari denaturasi (95°C; 15 detik), penempelan (*annealing*) (53°C; 15 detik), dan perpanjangan (*extension*) (72°C; 15 detik). Tahap terakhir adalah perpanjangan akhir (*final extension*) (72°C; 10 menit) dan pendinginan (*cooling*) (sampai suhu 15°C; 10 menit). Hasil amplifikasi PCR dievaluasi menggunakan gel agarose 1%.

Pemisahan DNA hasil amplifikasi dengan marka SSR

DNA hasil amplifikasi diseparasi menggunakan gel poliakrilamid (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE). Proses elektroforesis dimulai dengan penyiapan gel poliakrilamid denaturasi, yaitu membersihkan kaca dengan menambahkan larutan pengikat 2 μ l *Bind Silane* ke dalam 1 mL etanol 95% (v/v) dan 5 μ L asam asetat glasial 0,5% (v/v). Selanjutnya, sampel produk PCR sebanyak 2 μ l didenaturasi (94°C; 10 menit). Sampel tersebut kemudian dimasukkan pada celah sisir dan di-*running* dalam mesin elektroforesis (3000 Volt; 300 mA; 65 Watt; 2,5 jam).

Pewarnaan perak nitrat dimulai dengan perendaman kaca dalam larutan fiksasi selama 30 menit, kemudian dicuci dengan air bebas ion sebanyak 3 kali dan direndam dalam larutan perak nitrat selama 30

menit, setelahnya dicuci dengan air bebas ion. Tahap selanjutnya adalah merendam kaca pada larutan *developer* hingga nampak pola pita DNA. Proses pewarnaan diakhiri dengan merendam kaca pada larutan asam asetat glasial selama 5 detik dan dicuci dengan air bebas ion, setelah itu dikeringkan pada suhu ruang.

Skoring dan Analisis Data

Keragaman alel ditentukan oleh pola pita yang terbentuk dari masing-masing lokus. Skoring pita DNA dilakukan secara manual berdasarkan ukuran fragmen untuk menentukan apakah genotipe tersebut homozigot atau heterozigot. Selain itu, dilakukan penghitungan jumlah alel pada setiap marka SSR yang digunakan. Marka SSR adalah marka multi alel sehingga dapat diperoleh informasi jumlah alel untuk setiap primer yang digunakan. Analisis faktorial dan kontruksi pohon filogenetik dilakukan menggunakan software DARwin (*Dissimilarity Analysis and Representation for Windows*) versi 6.05 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2010). Matriks ketidaksamaan dianalisis berdasarkan data alel untuk tingkat ploidi = 2 dan *bootstrap* yang digunakan adalah pengulangan sebanyak 10.000.

Parameter genetik dari primer yang digunakan seperti jumlah alel (N), nilai heterozigositas teramati (Ho), nilai heterozigositas harapan (He), dan *Polymorphic Information Content* (PIC) dihitung menggunakan software Cervus 2.0 (Kalinowski *et al.*, 2007), sedangkan rata-rata alel (Na), rata-rata alel efektif (Ne), Ho dan He populasi dihitung menggunakan software GenAEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

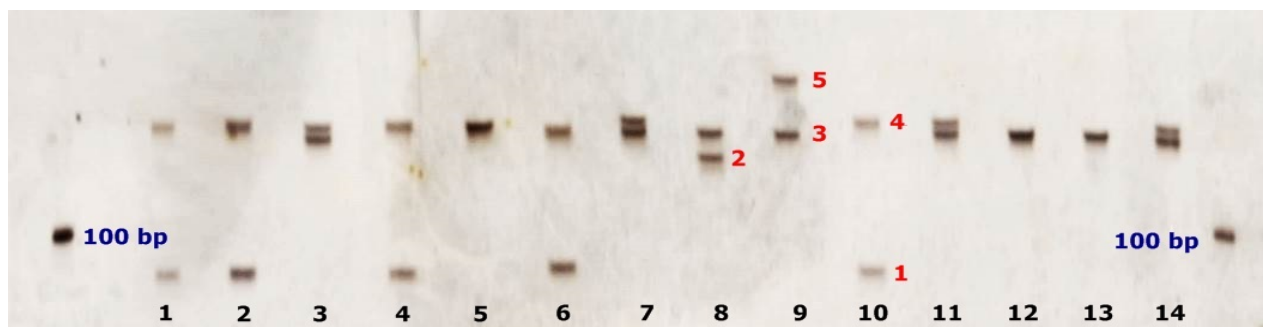
Keragaman Marka SSR

Berdasarkan hasil skoring, seluruh primer yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan pita yang polimorfik. Salah satu contoh hasil amplifikasi pada 28 klon kakao yang polimorfik ditunjukkan oleh primer mTcCIR103 (Gambar 1). Hasil skoring dari semua primer polimorfik tersebut selanjutnya digunakan dalam analisis statistik untuk mengetahui tingkat keragaman dari marka SSR.

Hasil analisis parameter genetik dari 20 primer SSR polimorfik disajikan pada Tabel 3. Masing-masing primer mempunyai ukuran alel yang berbeda, tergantung pada primer yang digunakan. Keseluruhan alel yang diperoleh adalah 88 alel bervariasi antara 4 hingga 6 alel per lokus dengan rata-rata 4,4 alel. Persentase primer polimorfik (PIC) tertinggi terdapat pada primer mTcCIR213 (0,716), sedangkan terendah pada primer mTcCIR103 (0,348). Nilai PIC > 0,5 menunjukkan bahwa lokus tersebut sangat informatif, sedangkan nilai PIC = 0,25–0,50 tergolong moderat

(Botstein, White, Skolnick, & Davis, 1980). Heterozigositas teramati tertinggi ditunjukkan oleh primer mTcCIR213 dengan nilai 0,857, sedangkan yang terendah terdapat pada lokus mTcCIR145 dengan nilai 0,250. Pada kakao, umumnya heterozigositas cukup tinggi karena kakao merupakan tanaman menyerbuk silang sehingga peluang berkumpulnya alel yang berbeda cukup tinggi. Walaupun bersifat heterozigot, klon kakao di Indonesia keragamannya cukup sempit karena diperbanyak secara klonal sehingga untuk meningkatkan keragaman dapat dilakukan dengan memasukkan klon

introduksi ataupun dengan melakukan persilangan buatan. Oleh karena itu, marka SSR yang mempunyai nilai PIC dan heterozigositas teramati yang tinggi dapat dipilih untuk melakukan analisis keragaman genetik karena dapat mengelompokkan klon-klon kakao berdasarkan sifat genetiknya. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Kurniasih *et al.* (2011), bahwa tingkat heterozigositas dan keragaman genetik yang cukup tinggi dari lokus SSR dapat digunakan untuk membedakan klon-klon yang dianalisis.



Gambar 1. Variabilitas alel hasil separasi pada 6% gel poliakrilamid denaturasi menggunakan primer mTcCIR103, 1–5 (merah): tipe alel yang muncul pada masing-masing klon, 100 bp: posisi ukuran 100 bp pada marker DNA

Figure 1. Allele variability shown by mTcCIR103 marker separated using 6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, 1–5 (red) refers to allele type presents on each clone, 100 bp refers to the size position of 100 bp on DNA marker

Tabel 3. Ukuran alel, jumlah alel per primer (N), persentase primer polimorfik (PIC), heterozigositas teramati (Ho), dan heterozigositas harapan (He) dari 20 primer SSR

Table 3. Allele size, allele numbers per primer (N), polymorphic information content (PIC), observed heterozygosity (Ho), and expected heterozygosity (He) of 20 SSR primers

Nama primer	LG	Ukuran alel (bp)	N	PIC	Ho	He
mTcCIR144	1	242	5	0,679	0,536	0,738
mTcCIR184	1	204	4	0,580	0,464	0,662
mTcCIR162	2	250	4	0,562	0,393	0,631
mTcCIR281	2	194	4	0,492	0,714	0,562
mTcCIR82	3	206	5	0,652	0,679	0,719
mTcCIR81	3	216	5	0,649	0,500	0,706
mTcCIR76	4	196	4	0,476	0,536	0,527
mTcCIR213	4	261	5	0,716	0,857	0,769
mTcCIR69	5	208	4	0,677	0,714	0,742
mTcCIR109	5	221	4	0,560	0,536	0,624
mTcCIR255	6	193	4	0,492	0,464	0,555
mTcCIR291	6	212	6	0,638	0,607	0,701
mTcCIR190	7	172	5	0,664	0,786	0,731
mTcCIR141	7	217	4	0,552	0,643	0,632
mTcCIR211	8	179	4	0,428	0,393	0,480
mTcCIR103	8	112	4	0,348	0,464	0,389
mTcCIR251	9	228	5	0,671	0,607	0,728
mTcCIR145	9	117	4	0,531	0,250	0,610
mTcCIR155	10	197	4	0,556	0,643	0,615
mTcCIR209	10	243	4	0,480	0,429	0,547
Rata-rata			4,5	0,570	0,561	0,633

Keterangan : LG (grup keterpautan) merupakan urutan posisi sejumlah lokus dalam kromosom

Notes : LG (linkage group) is the position of a number of loci on chromosomes

Tabel 4. Pendugaan jumlah rata-rata alel per primer (Na), rata-rata alel efektif (Ne), heterozigositas teramati (Ho), heterozigositas harapan (He), nilai indeks fiksasi (F), dan rata-rata jumlah alel spesifik pada masing-masing populasi kakao berdasarkan 20 marka SSR

Table 4. Estimation of average number of allele per primer (Na), average number of effective allele (Ne), observed heterozygosity (Ho) and expected heterozygosity (He), fixation index (F) and average number of specific allele on each cacao population based on 20 SSR markers

Populasi	Na	Ne	Ho	He	F	Alel spesifik
Klon unggul lokal	3,950	2,667	0,558	0,600	0,078	0,250
Klon komersial	4,150	2,769	0,563	0,611	0,079	0,450

Rata-rata jumlah alel (N) yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi dari studi sebelumnya yang dilakukan oleh Silva *et al.* (2011) terhadap 127 populasi kakao dari Amazon Brasil yang menghasilkan rata-rata jumlah alel 3,25 pada 8 lokus SSR. Namun, rata-rata jumlah alel yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Rubiyo *et al.* (2015) yang menggunakan 12 genotipe kakao dari Sulawesi Tenggara, yaitu 5 alel per lokus. Perbedaan jumlah alel dari masing-masing penelitian tersebut diduga dipengaruhi oleh jenis dan jumlah klon yang dianalisis serta jenis dan jumlah lokus yang digunakan.

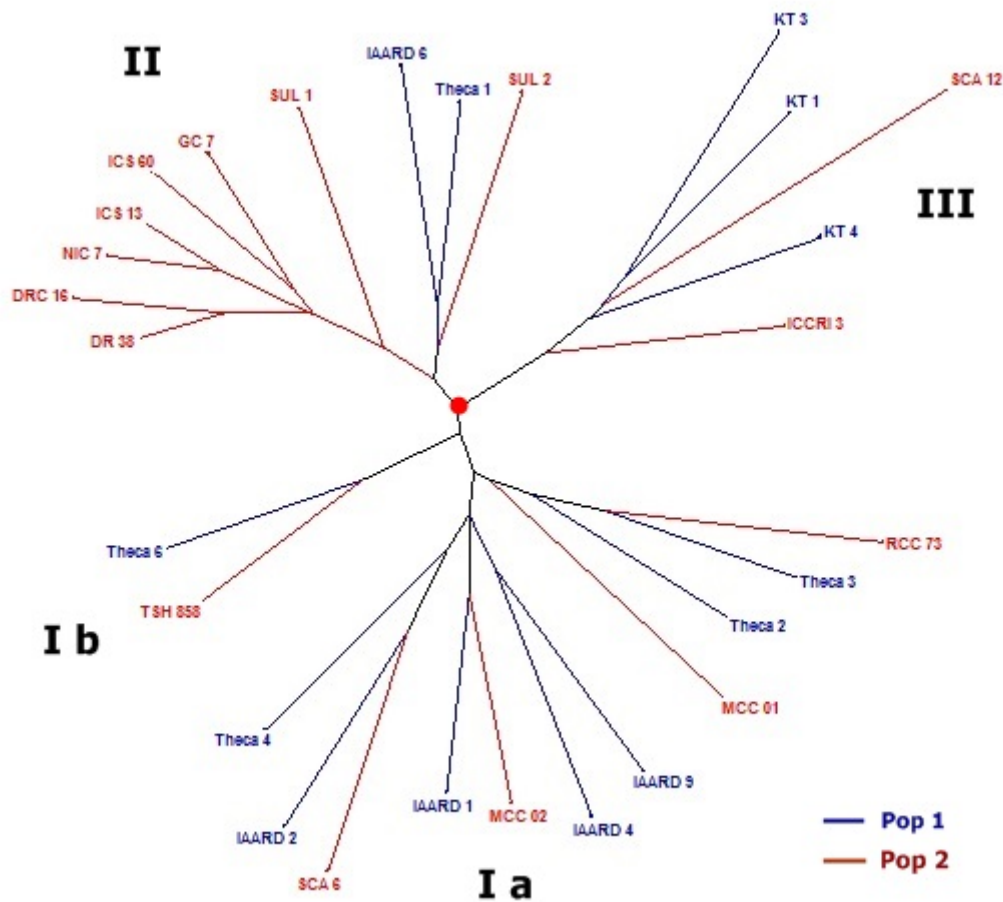
Pendugaan parameter genetik juga dilakukan pada dua populasi kakao yang diuji, yaitu populasi klon unggul lokal dan populasi klon komersial. Hasil analisis menunjukkan bahwa klon komersial mempunyai nilai rata-rata lebih tinggi untuk semua parameter dibandingkan dengan klon unggul lokal (Tabel 4). Hal ini berarti bahwa keragaman genetik antar klon komersial lebih besar dibandingkan dengan antar klon unggul lokal. Klon-klon komersial diduga berasal dari basis genetik yang lebih luas. Dua klon komersial generasi awal, yaitu DR 38 dan DRC 16, tergolong unik karena merupakan kakao tipe mulia/edel (penghasil biji putih) dari kelompok Trinitario. Keduanya memiliki jarak genetik yang jauh dengan tiga klon kakao komersial tipe lindak (penghasil biji ungu) dari kelompok Forastero, yaitu klon Sca 6, Sca 12, dan Sca 89 (Kurniasih *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil analisis ditemukan adanya alel spesifik pada kedua populasi yang diuji. Populasi klon unggul lokal mempunyai alel spesifik sebesar 0,25, sedangkan klon komersial mempunyai nilai alel spesifik lebih tinggi, yaitu 0,45. Alel spesifik adalah alel dengan pola pita unik yang dapat digunakan untuk membedakan

suatu genotipe tertentu dari genotipe lainnya (Rubiyo *et al.*, 2015). Ditemukannya alel spesifik pada suatu genotipe dapat dimanfaatkan dalam pengujian BUSS (baru, unik, seragam, stabil) yang diperlukan dalam pendaftaran varietas baru atau perlindungan varietas (Sitaresmi *et al.*, 2013; Pourabed *et al.*, 2015). Di samping itu, alel spesifik juga mengindikasikan adanya potensi genetik tertentu pada kedua populasi tersebut. Pada Tabel 4 juga menunjukkan nilai indeks fiksasi (F) positif, yaitu 0,078 pada klon unggul lokal dan 0,079 pada klon komersial. Nilai indeks fiksasi yang positif tersebut menandakan bahwa frekuensi alel antar populasi juga menentukan keseluruhan keragaman.

Keragaman Genetik 28 Klon Kakao

Keragaman genetik 28 klon kakao berdasarkan 20 marka SSR menggunakan metode *Neighbour Joining* dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil dari pohon filogenetik menunjukkan 3 kelompok besar pada klon kakao yang dianalisis. Kelompok pertama (I) terbagi menjadi dua sub kelompok, yaitu sub kelompok Ia terdiri dari 11 klon, antara lain Theca 2, Theca 3, Theca 4, IAARD 1, IAARD 2, IAARD 4, IAAD 9, MCC 01, MCC 02, RCC 73 dan Sca 6, sedangkan sub kelompok kedua (Ib) hanya terdapat dua klon, yaitu Theca 6 yang mewakili klon unggul lokal dan TSH 858 yang merupakan klon komersial. Kelompok kedua (II) terdiri dari 10 klon, meliputi 8 klon komersial (Sulawesi 1, Sulawesi 2, ICS 13, ICS 60, GC 7, NIC 7, DR 38, dan DRC 16) dan 2 klon unggul lokal (Theca 1 dan IAARD 6). Kelompok ketiga (III) hanya terdiri dari 5 klon, yaitu 3 klon unggul lokal (KT 1, KT 3, dan KT 4) dan 2 klon komersial (ICCRI 3 dan Sca 12).



Gambar 2. Pohon filogenetik 28 klon kakao berdasarkan 20 marka SSR menggunakan metode *Neighbour Joining*
Figure 2. *Phylogenetic tree of 28 cacao clones based on 20 SSR markers using Neighbor Joining method*

Pohon filogenetik memberi gambaran bahwa baik klon-klon unggul lokal maupun klon-klon komersial terbagi ke dalam tiga kelompok. Kemungkinan klon unggul lokal dan klon komersial tersebut mempunyai tetua yang sama sehingga mempunyai hubungan kekerabatan yang dekat. Sebagai contoh, klon unggul lokal dan klon komersial yang terdapat pada kelompok III berasal dari lokasi yang sama, yaitu kebun Kali Telepak, Banyuwangi. Diduga, klon Sca 12 yang banyak dibudidayakan di kebun Kali Telepak merupakan salah satu tetua dari klon unggul lokal (KT 1, KT 3, dan KT 4) dari wilayah tersebut. Sementara itu, klon ICCRI 3 tergabung di kelompok yang sama karena merupakan hasil persilangan antara DR 2 dan Sca 12 sehingga mempunyai kemiripan genetik cukup tinggi. Fenomena hampir sama juga terdapat pada klon-klon yang tergabung dalam kelompok I dan II. Meskipun diperoleh dari daerah berbeda, tetapi terdapat pada kelompok genetik yang sama karena diduga mempunyai asal usul sama. Dengan demikian, hasil penelitian ini sangat bermanfaat untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar klon unggul

lokal hasil observasi yang sebelumnya belum diketahui asal usul genetiknya.

Hasil pengelompokan ini juga memberikan informasi mengenai jarak genetik antar klon yang diuji. Klon-klon kakao pada grup berbeda mempunyai jarak genetik lebih jauh dibandingkan dengan klon-klon yang terdapat pada kelompok yang sama. Pengetahuan mengenai jarak genetik pada koleksi plasma nutfah kakao sangat berguna untuk memilih tetua persilangan dalam perakitan klon unggul baru. Dari pohon filogenetik, klon yang berpotensi menjadi tetua persilangan adalah klon-klon pada kelompok berbeda, misalnya klon IAARD 1 dan IAARD 2 yang terdapat pada grup I dengan klon KT 1, KT 3, dan KT 4 grup III atau klon grup II (ICS 60, DR 38, IAARD 6) disilangkan dengan klon pada grup III (ICCRI 3 dan Sca 12). Persilangan buatan tentunya juga harus mengarah kepada tujuan akhir yang mengacu pada tiga hal, yaitu produktivitas, kualitas/mutu, dan ketahanan terhadap OPT. Sebagai contoh, klon Sca 12 akan sesuai digunakan sebagai tetua jantan untuk merakit varietas unggul tahan penyakit busuk buah karena Sca 12

merupakan donor ketahanan terhadap penyakit tersebut (Rubiyo *et al.*, 2008). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa marka SSR merupakan alat bantu yang cukup potensial untuk menentukan tetua persilangan dalam upaya meningkatkan peluang heterosis pada keturunannya. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat membantu mempercepat program pemuliaan kakao di Indonesia.

KESIMPULAN

Marka SSR yang digunakan dalam penelitian terbukti mampu menganalisis keragaman genetik 28 nomor koleksi kakao dengan tingkat polimorfisme cukup tinggi. Pohon filogenetik terbagi menjadi 3 kelompok yang menempatkan klon unggul lokal dan klon komersial pada tiap-tiap kelompok. Berdasarkan analisis keragaman genetik ini dapat diketahui juga jarak genetik antar klon yang bermanfaat dalam pemilihan tetua persilangan. Klon-klon kakao yang terdapat pada kelompok berbeda dapat dipilih sebagai tetua persilangan dengan harapan untuk mendapatkan keturunan yang lebih unggul dari tetuanya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Januar Firmansyah, S.P., Tri Buana Dewi, dan Zikril Illahi, M.Si, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian atas program beasiswa tugas belajar tahun anggaran 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, G.C., Vergara, M.A., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W.F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyl trimethylammonium bromide. *Nat. Prot.*, 1, 2320–2325.
- Azrai, M. (2005). Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *Jurnal Agro Biogen*, 1(1), 26–27.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–31.
- Izzah, N.K. (2014). Peran marka molekuler dalam perbaikan genetik tanaman kakao. In Rubiyo, R. Harni, B. Martono, E. Wardiana, N.K. Izzah, & A.M. Hasibuan (Eds.), *Bunga Rampai Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao* (pp. 47–56). Bogor: IAARD Press.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177, 309–334.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., & Marshall, T.C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.*, 16, 1099–1106.
- Kurniasih, S., Rubiyo, Setiawan, A., Purwantara, A., & Sudarsono. (2011). Analisis keragaman genetik plasma nutfah kakao (*Theobroma cacao L.*) berdasarkan marka SSR. *Jurnal Littri.*, 17(4), 156–162.
- Lanaud, C., Risterucci, A.M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., & Lagoda P.J.L. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao L.* *Mol Ecol*, 8, 2142–2152.
- Parida, S.K., Yadava, D.K., & Mohapatra, T. (2010). Microsatellites in *Brassica unigenes*: Relative abundance, marker design, and use in comparative physical mapping and genome analysis. *Genome*, 53, 55–67.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet J.P. (2010). *DARwin software*. Retrieved from <http://darwin.cirad.fr/>.
- Pourabed, E., Noushabadi, M. R. J., Jamali, S. H., Alipour, N. M., Zareyan, A., & Sadeghi, L. (2015). Identification and DUS testing of rice varieties through microsatellite markers. *Int. J. Plant Genomics*. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/965073>.
- Rubiyo, Purwantara, Suhendi, Trikusumaningtyas, Ilyas, I., & Sudarsono. (2008). Uji ketahanan kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap penyakit busuk buah dan efektivitas metode inokulasi. *Pelita Perkebunan*, 24, 95–113.
- Rubiyo. (2013). Inovasi teknologi perbaikan bahan tanam kakao di Indonesia. *Buletin RISTR*, 4(3), 199–214.
- Rubiyo, Izzah, N.K., Sulistiyorini, I., & Tresniawati, C. (2015). Evaluation of genetic diversity in cacao collected from Kolaka, Southeast Sulawesi, using SSR markers. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 16(2), 71–78.
- Santos, R.M.F., Lopes, U.V., Clement, D., Pires, J.L., Lima, E.M., Messias, T.B., & Gramacho, K.P. (2014). A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 814–820.

- Silva, C.R.S., Albuquerque, P.S.B., Ervedosa, F.R., Mota, J.W.S., Figueira, A., & Sebben, A.M. (2011). Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon. *Heredity*, 106, 973–985.
- Sitairesmi, T., Yunani, N., Zakki, K.A.F., Mulsanti, I.W., Utomo, S.T.W., & Daradjat, A.A. (2013). Identifikasi varietas contoh untuk karakter penciri spesifik sebagai penunjang harmonisasi pengujian BUSS padi. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 32(3), 148–158.
- Susilo, A.W. (2007). Akselerasi program pemuliaan kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui pemanfaatan penanda molekuler dalam proses seleksi. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*, 23(1), 11–24.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., & Graner, A. (2013). Exploiting EST database for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 106, 411–42.
- Zhang, D., Mischke, S., Johnson, E.S., Phillips-Mora, W., & Meinhardt, L. (2009). Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. *Tree genetic & Genomic*, 5, 1–10.