ANALISIS KEKERABATAN GENETIK KULTIVAR KOPI ARABIKA BERBUAH KUNING DAN BERBUAH MERAH BERDASARKAN MARKA SSR

GENETIC RELATIONSHIPS OF YELLOW BERRY AND RED BERRY CULTIVARS OF ARABICA COFFEE BASED ON SSR MARKERS

[*] Nur Kholilatul Izzah, Enny Randriani, dan Dani

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
[*] *lila_ref@yahoo.co.id*

(Tanggal diterima: 7 September 2015, direvisi: 28 September 2015, disetujui terbit: 10 November 2015)

ABSTRAK

Kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) merupakan kultivar lokal yang berpeluang untuk dilepas sebagai varietas unggul. Namun, asal-usul genetiknya (*genetic background*) belum jelas. Padahal, karakter itu merupakan salah satu syarat dalam pelepasan varietas. Penelitian bertujuan menganalisis kekerabatan genetik kultivar AGK-1 dengan 11 kultivar kopi Arabika berbuah merah berdasarkan marka *simple sequence repeats* (SSR). Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Molekuler Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) Sukabumi, dan Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Bogor, mulai Maret sampai Juni 2015. Kedua belas kultivar kopi Arabika yang digunakan berasal dari Kabupaten Garut. Sebanyak 12 primer SSR digunakan untuk menelusuri kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika. Kekerabatan genetik dianalisis menggunakan marka SSR untuk melihat polimorfisme dan *clustering*. Hasil penelitian menunjukkan kedua belas marka SSR yang digunakan mampu mengidentifikasi kekerabatan 12 kultivar kopi Arabika ke dalam tiga kelompok (pada nilai ambang 66%). Pengelompokan secara genetik berkaitan dengan morfologi tanaman, terutama karakter pertumbuhan, yaitu tinggi, semi katai, dan katai. Kultivar AGK-1 secara genetik berkerabat dekat dengan salah satu kultivar berbuah merah, yaitu ABP-2 yang berasal dari Brasil dan keduanya mempunyai tipe pertumbuhan semi katai. Kultivar AGK-1 berbuah kuning diduga merupakan hasil persarian bebas dari tetua berbuah merah, terutama kultivar ABP-2. Dengan demikian, kopi Arabika berbuah kuning AGK-1 merupakan kultivar yang unik dan berpeluang untuk dilepas sebagai varietas unggul lokal.

Kata kunci: *Coffea arabica*, kekerabatan genetik, marka SSR

ABSTRACT

Yellow berry of Arabica coffee (AGK-1) cultivated in Garut is a local cultivar that potentially could be released as a superior variety. However, its genetic background has not been studied. Information of genetic background is one of the requirement in releasing of a new variety. The objective of this research was to analyze the genetic relationships of AGK-1 cultivar with 11 red berries Arabica coffee cultivars based on simple sequence repeats (SSR) markers to find polymorphisms and clustering. The research was carried out at the Molecular Laboratory of Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute and Biology Molecular Laboratory of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, from January to March 2015. These twelve Arabica coffee cultivars were obtained from Garut Regency. A total of 12 SSR primers were used to investigate the genetic relationships of the plant. The result showed that 12 SSR markers were adequate to identify the relationships among 12 Arabica coffee cultivars. The genetic clustering obtained in this study is related to plant morphology, particularly plant growth characters, such as tall, semi dwarf and dwarf. AGK-1 cultivar genetically related to ABP-2, one of red berries cultivars that originated from Brazil. Both of these cultivars have the same growing type characters (i.e. semi dwarf). AGK-1 cultivar that has yellow berry color presumably derived from an open pollinated red berries parents, mainly ABP-2 cultivar. Therefore, AGK-1 is a unique cultivar that could be released as a local superior variety.

Keywords: Coffea arabica*, genetic relationships, SSR markers*

PENDAHULUAN

Kopi Arabika termasuk tanaman yang bernilai ekonomi tinggi dan dikembangkan di lebih dari 60 negara beriklim tropis maupun subtropis, dan jumlah produksinya bisa mencapai 70% dari total produksi kopi dunia (Teressa, Crouzillat, Petiard, & Brouhan, 2010). Di Indonesia, kopi merupakan salah satu komoditas perkebunan yang cukup diperhitungkan dan sebagai sumber devisa negara. Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

merupakan satu-satunya spesies dari genus *Coffea* yang termasuk ke dalam tanaman tetraploid (2n=2x=44) dan bersifat menyerbuk sendiri (Geleta, Herrera, Monzon, & Bryngelsson, 2012). Berdasarkan hibridisasi *in situ* secara genomik menunjukkan *C. arabica* berasal dari persilangan antara *C. eugenioides* dan *C. canephora* (Lashermes *et al.*, 1999). Kopi Arabika pertama kali ditemukan pada tahun 850 di Ethiopia dan disebarkan ke beberapa negara Islam oleh para peziarah (Sera *et al.*, 2003). Pada awal abad ke-18, tanaman kopi dibawa ke Indonesia oleh VOC dan pertama kali ditanam pada tahun 1707 di wilayah Priangan (Zakaria, 2012).

Kopi Arabika pada umumnya dikembangkan di daerah-daerah dengan ketinggian lebih dari 1000 m dpl. Garut, salah satu daerah yang terletak di Provinsi Jawa Barat, dikenal sebagai penghasil kopi Arabika dengan kualitas baik. Salah satu kultivar lokal yang banyak dikembangkan petani saat ini adalah kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1). Keunggulan dari kultivar AGK-1 adalah produktivitasnya tinggi, ukuran bijinya besar, dan mutu citarasanya tergolong *specialty* (Randriani, Dani, & Wardiana, 2014). Kultivar harapan tersebut berpotensi untuk dilepas sebagai varietas unggul lokal.

Petani di Garut umumnya menanam lebih dari satu kultivar kopi Arabika, seperti AGK-1, S795, Andungsari, Sigarar Utang, dan Buhun dalam hamparan yang sama (Randriani *et al.*, 2014). Semua kultivar kopi tersebut, kecuali AGK-1, mempunyai ciri buah berwarna merah. Berdasarkan informasi yang diperoleh dari petani, kultivar AGK-1 berasal dari tetua yang berbuah merah, tetapi identitas tetuanya tidak diketahui dengan jelas. Oleh sebab itu, perlu dianalisis kekerabatan genetik kultivar AGK-1 dengan kultivar lain yang diduga sebagai tetuanya. Pendekatan yang dapat digunakan untuk menganalisis kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika adalah melalui pemanfaatan teknologi marka molekuler, seperti marka *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *simple sequence repeat* (SSR) yang diketahui dapat mengelompokkan kultivar kopi Arabika sesuai dengan asal-usul genetiknya (Maluf *et al.*, 2005).

Marka yang sering digunakan untuk menganalisis kekerabatan genetik kopi Arabika adalah SSR karena mempunyai beberapa keuntungan, antara lain: (1) tingkat polimorfisme dan reproduktivitas yang tinggi, (2) bersifat kodominan sehingga bisa membedakan alel homozigot dan heterozigot, (3) mudah terdeteksi dengan metode PCR, dan (4) mempunyai lokasi kromosom yang spesifik (Teressa *et al.*, 2010; Kalia, Rai, Kalia, Singh, & Dhawan, 2011). Beberapa peneliti telah membuktikan keefektifan marka SSR dalam analisis keragaman genetik kopi Arabika. Geleta *et al.* (2012) berhasil mengelompokkan 26 populasi kopi Arabika di Nikaragua menjadi 5 kelompok berdasarkan marka SSR, sedangkan Teressa *et al.* (2010) berhasil membagi 133 kultivar kopi Arabika menjadi 2 grup. Grup pertama terdiri atas kultivar kopi yang berasal dari Ethiopia dan kedua beranggotakan kultivar kopi yang sudah dibudidayakan. Penggunaan marka SSR diharapkan dapat mengelompokkan kultivar AGK-1 dengan kultivar lain yang diduga sebagai tetuanya serta membedakannya dengan kultivar yang sudah dilepas. Selain itu, juga dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan tetua persilangan berdasarkan pada nilai jarak genetiknya. Penelitian bertujuan menganalisis kekerabatan genetik kultivar AGK-1 dengan 11 kultivar kopi Arabika berbuah merah berdasarkan marka SSR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Molekuler, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) Sukabumi, dan Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik (BB Biogen) Bogor, mulai Maret sampai Juni 2015.

Materi Tanaman dan Ekstraksi DNA

Materi genetik yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dan 11 kultivar kopi Arabika berbuah merah banyak dikembangkan oleh petani di Kabupaten Garut, Jawa Barat (Tabel 1) yang mewakili tiga tipe pertumbuhan, yaitu tinggi, semi katai, dan katai (Gambar 1). Contoh daun dari masing-masing kultivar kopi Arabika tersebut dikoleksi untuk digunakan sebagai bahan ekstraksi DNA. Sebanyak 3 g contoh daun kopi yang masih muda dan sehat dipotong kecil-kecil kemudian dihaluskan menggunakan mortar dan pestle. Ekstraksi DNA genomik kopi Arabika dilakukan berdasarkan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (Allen, Flores-Vergara, Krasynanski, Kumar, & Thompson, 2006). Selanjutnya, dilakukan pengukuran kuantitas DNA menggunakan alat NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Analisis PCR dilakukan pada setiap contoh DNA yang diencerkan dengan larutan 1x bufer TE sampai konsentrasi 10 ng/µl.

Tabel 1. Karakteristik dua belas kultivar kopi Arabika yang digunakan dalam penelitian
Table 1. Characteristics of twelve Arabica coffee cultivars used in this research

Kultivar	Karakteristik utama	Sumber contoh daun
AGK-1	Tipe pertumbuhan semi katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak kuning, biji besar	Desa Margamulya, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut
ABP-4	Tipe pertumbuhan katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak merah tua, biji kecil	Desa Margamulya, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut
ABP-2 (bibit asal biji)	Tipe pertumbuhan semi katai, ruas pendek, daun pucuk kecokelatan, buah masak merah tua,biji besar	Desa Margamulya, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut
ABP-3	Tipe pertumbuhan katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak merah, biji kecil	Desa Margamulya, Kecamatan Cikajang, Kabupaten Garut
Ateng	Tipe pertumbuhan semi katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak merah, biji besar	Desa Kramat Wangi, Kecamatan Cisurupan, Kabupaten Garut
Preanger	Tipe pertumbuhan tinggi, ruas panjang, daun pucuk kecokelatan, buah masak merah, biji besar	Desa Kramat Wangi, Kecamatan Cisurupan, Kabupaten Garut
Buhun LM	Tipe pertumbuhan tinggi, ruas panjang, daun pucuk merah kecokelatan, buah masak merah, biji besar	Desa Sukalilah, Kecamatan Sukaresmi, Kabupaten Garut
Buhun	Tipe pertumbuhan tinggi, ruas panjang, daun pucuk kecokelatan, buah masak merah, biji besar	Desa Sukalilah, Kecamatan Sukaresmi, Kabupaten Garut
S-795	Tipe pertumbuhan tinggi, ruas panjang, daun pucuk kecokelatan, buah masak merah, biji besar	Kebun Percobaan Pakuwon, Balittri, Sukabumi
Sigarar Utang (bibit asal biji)	Tipe pertumbuhan semi-katai, ruas pendek, daun pucuk kecokelatan, buah masak merah, biji besar	Kebun Percobaan Pakuwon, Balittri, Sukabumi
Andungsari 2K (bibit asal setek)	Tipe pertumbuhan semi katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak merah, biji besar	Kebun Induk milik Dinas Perkebunan, Kabupaten Garut
Kartika1	Tipe pertumbuhan katai, ruas pendek, daun pucuk hijau, buah masak merah tua, biji besar	Kebun Percobaan Pakuwon, Balittri, Sukabumi

Sumber/*Source*: Randriani *et al.* (2014)

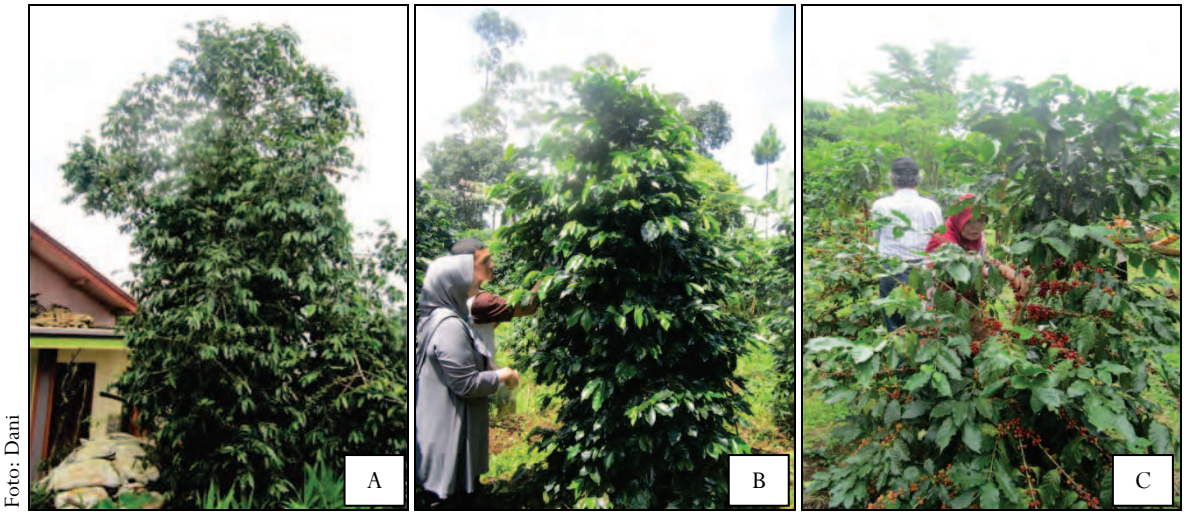


Foto: Dani

Gambar 1. Tipe pertumbuhan tanaman kopi Arabika: (a) tinggi (kultivar Buhun), (b) semi katai (kultivar AGK-1), dan katai (kultivar Kartika 1)
Figure 1. Growing types of Arabica coffee plant: (a) tall (Buhun cultivar), (b) semi-dwarf (AGK-1 cultivar), and (c) dwarf (Kartika 1 variety)

Analisis SSR

Amplifikasi 12 DNA kultivar kopi Arabika menggunakan 12 primer SSR yang didesain dari sekuen kopi Arabika (Combes *et al.*, 2000; Missio, Caixeta, Zambolim, Zambolim, & Sakiyama, 2009; Teressa *et al.*, 2010) (Tabel 2). Komposisi bahan kimia yang digunakan adalah 10 ng DNA, 0,2 µM primer dan 1x *PCR mix* dengan volume akhir 15 µl. Proses amplifikasi DNA dilakukan melalui program PCR dengan tahapan sebagai berikut: (1) pre-denaturasi pada suhu 95 °C selama 3 menit; (2) denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 53 °C selama 15 detik dan perpanjangan (*extension*) pada suhu 72 °C selama 15 detik, semua proses dalam tahap dua ini diulang sebanyak 35 siklus; dan (3) perpanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72 °C selama 10 menit. Hasil amplifikasi PCR kemudian dicek menggunakan elektroforesis dengan gel agarose 1% yang sudah mengandung pewarna *gel red* pada larutan 0,5x bufer TBE. Setelah semua DNA kultivar kopi teramplifikasi dengan sempurna maka proses selanjutnya adalah separasi menggunakan 6% gel poliakrilamid non-denaturasi pada larutan 1x bufer TBE. Gel hasil elektroforesis tersebut kemudian diwarnai menggunakan larutan *ethidium bromide* selama 20 menit dan divisualisasi pada UV transluminator menggunakan *gel documentation system*.

Analisis Data

Hasil amplifikasi dari setiap marka SSR yang menunjukkan polimorfisme selanjutnya diberi skor dalam format data biner, yaitu 1 apabila terdapat pita dan 0 apabila tidak ada pita. Matrik data biner tersebut kemudian digunakan untuk melakukan analisis dengan program NTSYS-PC versi 2.1 (Rohlf, 2000). Pengelompokan semua kultivar kopi Arabika dilakukan berdasarkan matrik kesamaan genetik dengan menggunakan *unweighted pair group arithmetic mean method* (UPGMA). Jarak genetik antar kultivar kopi dihitung menggunakan rumus 1-matrik kesamaan genetik. Beberapa komponen penting seperti jumlah alel, jumlah alel spesifik, frekuensi alel mayor, keragaman gen (*gene diversity*), heterozigositas dan nilai *polymorphic information content* (PIC) dianalisis menggunakan program PowerMarker versi 3.25 (Liu & Muse, 2005). Penghitungan alel spesifik didasarkan pada jumlah alel yang kurang dari 5%, sedangkan frekuensi alel mayor dihitung berdasarkan jumlah alel terbanyak.

Tabel 2. Daftar primer SSR yang digunakan untuk analisis kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika
Table 2. List of SSR markers used for genetic relationships analysis of Arabica coffee cultivars

Nama lokus SSR	Motif pengulangan	Sekuen primer (*Forward*)	Sekuen primer (*Reverse*)	Ukuran alel (bp)
M2a	$(GT)_8/(GT)_6/(GT)_7$	AGTGGTAAAAGCCGTTGGTG	GCGGTTGTTGGTGAGTTGAA	205-218
M24	$(CA)_{15}(CG)_4CA$	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	132-166
M25	$(GT)_3CT(GT)_2/(GT)_{12}$	CCCTCCCTGCCAGAAGAAGC	AACCACCGTCCTTTTCCTCG	160-170
M20	$(GA)_5(GT)_8TT(GT)_4TT(GT)_7(GA)_{11}(TC)_2(CT)_3GT$	CTTGTTTGAGTCTGTCGCTG	TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	240-270
CMA055	$(TG)_{18}$	TTGAGCAAAAACCCTATTCC	TAAACCCAAAAAGACCACAA	
SSRCa 052	$(TTG)_7$	GATGGAAACCCAGAAAGTTG	TAGAAGGGCTTTGACTGGAC	129
SSRCa 018	$(GT)_{18}(GA)_{10}$	GTCTCGTTTCACGCTCTCTC	ATTTTTGGCACGGTATGTTC	115
M27	$(GT)_{11}$	AGGAGGGAGGTGTGGGTGAAG	AGGGGAGTGGATAAGAAGG	118-134
M29	$(CTCACA)_4/(CA)_9$	GACCATTACATTTCACACAC	GCATTTTGTTGCACACTGTA	103-122
M32	$(CA)_3/(CA)_3/(CA)_{18}$	AACTCTCCATTCCCGCATTC	CTGGGTTTTCTGTGTTCTCG	89-135
M42	$(GT)_3/(GT)_7$	ATCCGTCATAATCCAGCGTC	AGGCCAGGAAGCATGAAAGG	72-103
M47	$(CT)_9(CA)_8/(CT)_4/(CA)_5$	TGATGGACAGGAGTTGATGG	TGCCAATCTACCTACCCCTT	100-132

Sumber/*Source*: Combes *et al.* (2000), Missio *et al.* (2009), Teressa *et al.* (2010)

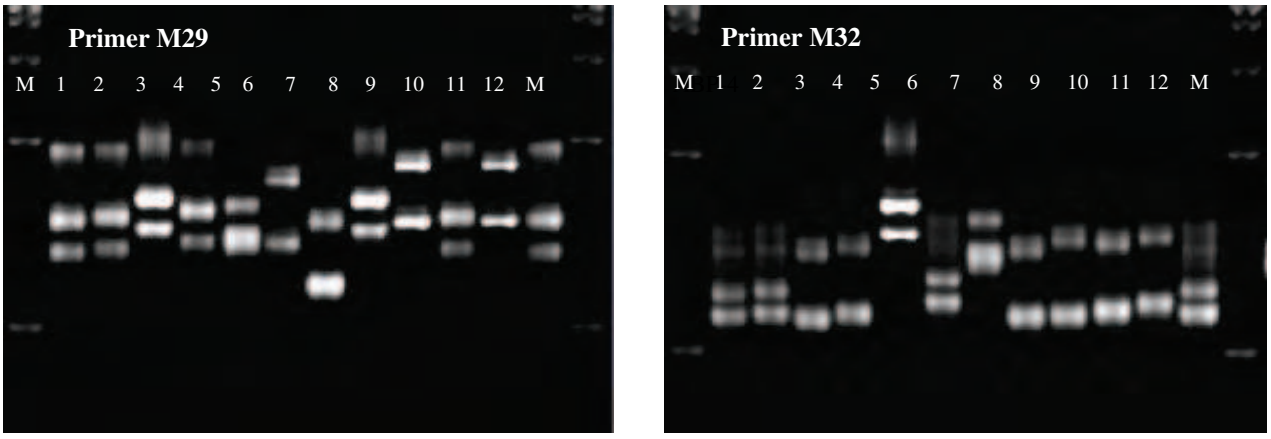
HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Alel dari Marka SSR

Hasil *genotyping* dari 12 marka SSR menunjukkan semua marka dapat mengamplikasi DNA kopi Arabika dengan sempurna. Dari semua marka yang teramplifikasi, sepuluh marka menghasilkan pita polimorfik, satu marka memperlihatkan pita monomorfik dan satu marka yang lain mempunyai pita tidak spesifik. Untuk keperluan analisis kekerabatan genetik dan analisis statistik lainnya, hanya digunakan marka-marka yang menghasilkan pita polimorfik untuk diberi skor dalam bentuk data biner. Marka SSR yang menunjukkan hasil pita polimorfik dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil analisis PowerMaker memperlihatkan jumlah alel yang beragam dari setiap lokus SSR, yaitu antara lima alel (primer CMA055) sampai 13 alel (primer M47), dengan jumlah rata-rata 8 alel untuk semua kultivar kopi Arabika yang diamati (Tabel 3). Jumlah total alel yang berhasil dideteksi dari sepuluh marka SSR yang menghasilkan pita polimorfik adalah 83 alel. Nilai rata-rata jumlah alel per lokus dan jumlah total alel yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Teressa *et al.* (2010), yaitu 6,5 alel per lokus dengan jumlah total 200 alel pada 133 aksesi kopi Arabika dengan menggunakan 32 marka SSR. Sementara, Maluf *et al.* (2005) yang melakukan penelitian pada 28 kultivar kopi Arabika menggunakan 23 marka SSR mendapatkan jumlah total 65 alel dengan rata-rata 2,87 alel per lokus. Perbedaan nilai rata-rata jumlah alel per lokus dan jumlah total alel tersebut diduga dipengaruhi oleh perbedaan jumlah dan jenis kultivar, serta perbedaan jumlah marka SSR yang digunakan. Kemungkinan lainnya adalah cakupan genom dari marka SSR yang digunakan, yaitu apabila cakupan genomnya lebih luas dari total genom maka dapat menjadi salah satu faktor pembatas dalam studi kekerabatan genetik kopi Arabika. Hal ini disebabkan oleh kurangnya ketersediaan marka SSR yang dapat dimanfaatkan (Teressa *et al.*, 2010).

Parameter genetik lain yang dapat menunjukkan keragaman alel adalah frekuensi alel mayor, jumlah alel spesifik, keragaman gen, heterozigositas, dan nilai PIC. Nilai frekuensi alel mayor terendah adalah 0,18 (primer M47) sedangkan yang tertinggi adalah 0,58 (primer CMA055). Jumlah alel spesifik yang teridentifikasi adalah 30 alel menyebar pada 9 lokus SSR. Lokus SSR yang mempunyai jumlah alel spesifik terbanyak adalah primer M47 (9 alel) diikuti oleh primer M32 (6 alel). Penentuan alel spesifik ini sangat bermanfaat bagi para pemulia terutama dalam hal identifikasi kultivar, yaitu untuk membedakan kultivar satu dengan lainnya sehingga duplikasi kultivar dalam koleksi plasma nutfah dapat dihindari (Rubiyo, Izzah, Sulistiyorini, & Tresniawati, 2015).



Gambar 2. Profil pita polimorfik 12 DNA kultivar dan kultivar kopi Arabika hasil amplifikasi menggunakan primer M29 dan M32 setelah diseparasi dengan 6% gel poliakrilamid non-denaturasi. 1= ABP-4; 2 = ABP-2; 3 = ABP-3; 4 = AGK-1; 5 = Sigarar Utang; 6 = S-795; 7 = Ateng; 8 = Preanger; 9 = Buhun LM; 10 = Buhun; 11 = Andungsari 2K; dan 12 = Kartika1.

Figure 2. Profile of polymorphic bands of 12 DNA Arabica coffee cultivars amplified using primer M29 and M32 separated by 6% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. 1= ABP-4; 2 = ABP-2; 3 = ABP-3; 4 = AGK-1; 5 = Sigarar Utang; 6 = S-795; 7 = Ateng; 8 = Preanger; 9 = Buhun LM; 10 = Buhun; 11 = Andungsari 2K; dan 12 = Kartika1.

Tabel 3. Karakteristik dari 10 marka SSR polimorfik yang digunakan untuk menganalisis kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika
Table 3. Characteristics of ten polymorphic SSR markers used to analyze genetic relationships of Arabica coffee cultivars

Lokus SSR	Jumlah alel	Frekuensi alel mayor	Jumlah alel spesifik	Keragaman gen	Heterozigositas	PIC*
CMA055	5	0,58	1	0,61	0,08	0,57
M20	8	0,29	3	0,81	0,92	0,78
M24	7	0,32	2	0,79	0,18	0,76
M27	7	0,29	1	0,82	1,00	0,80
Ca018	7	0,25	2	0,81	0,92	0,78
M47	13	0,18	9	0,89	1,00	0,88
M42	7	0,29	2	0,79	1,00	0,76
M29	10	0,29	4	0,84	1,00	0,83
M32	12	0,29	6	0,86	1,00	0,85
Ca052	7	0,29	-	0,82	1,00	0,80
Mean	8,3	0,31	3	0,80	0,81	0,78

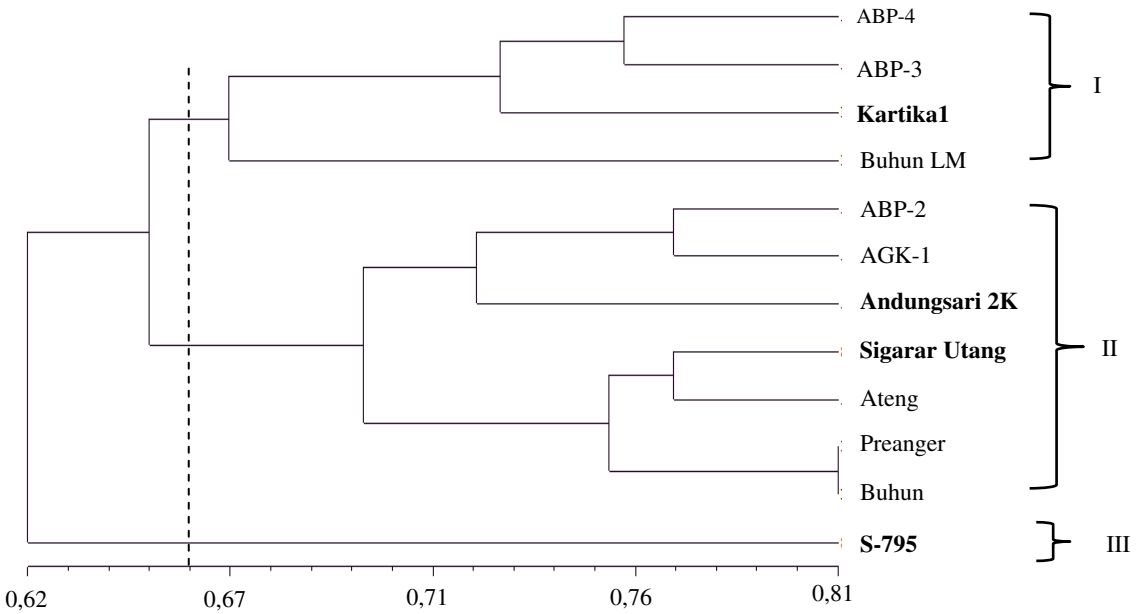
Keterangan/*Notes*: *PIC, *Polymorphic information content*

Lokus M47 mempunyai nilai keragaman tertinggi, yaitu 0,89. Sebaliknya lokus CMA055 mempunyai nilai terendah (0,61). Nilai rata-rata untuk semua lokus adalah 0,80. Rata-rata nilai PIC yang diperoleh pada penelitian ini adalah 0,78; nilai tertinggi dihasilkan pada lokus M47 (0,88) dan terendah pada lokus CMA055 (0,57) (Tabel 3). Enam lokus SSR, yaitu M27, M47, M42, M29, M32, dan Ca052 mempunyai nilai heterozigositas sempurna (1,00), sedangkan dua lokus (CMA055 dan M24) mempunyai nilai heterozigositas rendah, masing-masing 0,08 dan 0,18, sedangkan rata-rata nilai heterozigositas dari semua lokus adalah 0,81. Variasi alel yang cukup beragam dari tiap marka SSR dalam penelitian ini mengindikasikan marka tersebut cukup bermanfaat dalam membedakan antar kultivar kopi Arabika. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Kurniasih, Rubiyo, Setiawan, Purwantara, & Sudarsono (2011) dan Rubiyo *et al.* (2015). Tingginya rata-rata nilai heterozigositas menunjukkan 12 kultivar kopi Arabika yang banyak dikembangkan petani di Garut merupakan tipe hibrida.

Kekerabatan Genetik

Analisis kekerabatan genetik merupakan suatu langkah penting dalam upaya penelusuran asal-usul genetik dan penentuan tetua persilangan. Penentuan kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dengan 11 kultivar kopi Arabika berbuah merah yang banyak dikembangkan di Garut dilakukan dengan menggunakan program NTSYS. Nilai koefisien kesamaan genetik 66% digunakan sebagai ambang untuk mengelompokkan semua kultivar yang dievaluasi, seperti yang dilakukan oleh Jain, Jain, & McCouch (2004) dan Izzah *et al.*, (2013). Hasil dendrogram memperlihatkan semua kultivar kopi Arabika terbagi menjadi tiga kelompok utama (Gambar 3). Kelompok I terdiri dari empat kultivar, yaitu ABP-3, ABP-4, Buhun LM, dan Kartika 1. Kelompok II terdiri dari tujuh kultivar, yaitu ABP-2, AGK-1, Ateng, Preanger, Buhun, Andungsari 2K, dan Sigarar Utang. Kelompok III hanya beranggotakan satu kultivar, yaitu S-795.

Perbedaan antar kelompok dapat dikaitkan dengan karakteristik morfologi, terutama tipe pertumbuhan. Kelompok pertama secara umum ditandai dengan karakteristik pertumbuhan katai. Kultivar Kartika 1 merupakan varietas kopi Arabika generasi awal dengan karakteristik pertumbuhan katai (*dwarf*) yang berasal dari hasil seleksi dalam populasi keturunan persilangan Caturra Vermelho (CIFC 19/1) dan Hibrido de Timor (HdT) (CIFC 832/1). Kultivar ABP-3 dan ABP-4 menunjukkan kemiripan secara morfologi dengan kultivar Kartika 1, yaitu tipe pertumbuhan katai, ruas cabang pendek, warna daun muda hijau, dan warna buah masak merah tua. Karakteristik berbeda ditunjukkan oleh satu anggota lainnya dalam kelompok ini, yaitu kultivar Buhun LM. Kultivar tersebut memiliki tipe pertumbuhan tinggi, ruas cabang panjang, warna daun pucuk merah kecokelatan, dan warna buah masak merah sehingga lebih mirip dengan kultivar Preanger dan Buhun.



Gambar 3. Kekerabatan genetik 12 kultivar kopi Arabika berdasarkan marka SSR. Genotipe kopi dengan cetak tebal merupakan kultivar yang sudah dilepas

Figure 3. Genetic relationships of 12 Arabica coffee cultivars based on SSR markers. Genotypes identified with bold typed are released varieties.

Kelompok II secara morfologis ditandai dengan karakteristik pertumbuhan semi katai (kultivar AGK-1, ABP-2, Andungsari 2K dan Sigarar Utang), kecuali kultivar Preanger, Buhun (tipe tinggi), dan Ateng (tipe katai). Hasil analisis menunjukkan bahwa kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) berkerabat dekat dengan kultivar ABP-2 yang berbuah merah pada tingkat kemiripan 77% dan diduga merupakan tipe *Caturra* yang diintroduksi dari Brasil. Keduanya juga mengelompok dengan kultivar Andungsari 2K hasil seleksi individu dalam populasi *Catimor* (Caturra x Hibrido de Timor) dan Sigarar Utang yang diduga berasal dari persilangan alami antara tipe *Typica* BLP dengan *Catimor*. Di sisi lain, kultivar Preanger/Buhun diduga merupakan tipe *Java Typica*, yaitu kultivar kopi Arabika yang pertama kali dikembangkan pada masa kolonial Belanda. Meskipun menunjukkan tipe pertumbuhan berbeda, kedekatan kultivar Sigarar Utang dengan kultivar Preanger/Buhun (tipe tinggi) diduga karena sama-sama memiliki genom *Typica* (Kementarian Pertanian [Kementan], 2005; Kementan, 2010).

Pengelompokan ke dalam kelompok genotipe yang sama untuk kultivar-kultivar yang secara morfologi berbeda diduga karena kurangnya marka SSR yang digunakan. Fenomena serupa juga ditemukan pada spesies *Brassica oleracea*, yaitu terjadi penggabungan antara kultivar brokoli dan bunga kol pada kelompok genetik yang sama meskipun secara morfologis berbeda (Louarn, Torp, Holme, Andersen, & Jensen, 2007). Oleh karena itu, disarankan mengeksplorasi marka SSR lebih banyak agar dapat memisahkan kultivar Ateng, Preanger, dan Buhun dari kelompok II maupun kultivar Buhun LM dari kelompok I.

Pada kelompok III hanya terdiri dari satu kultivar, yaitu S-795, merupakan kultivar anjuran yang diintroduksi dari India dan dilepas pada tahun 1995. Karakteristik morfologi dari kultivar tersebut mirip dengan kultivar Preanger/Buhun, yaitu tipe pertumbuhan tinggi. Berdasarkan asal-usulnya, kultivar tersebut merupakan hasil persilangan alami antara *C. arabica* dan *C. liberica* karena di dalam genomnya terdapat beberapa segmen kromosom *C. liberica* (Prakash *et al*., 2004). Perbedaan asal-usul genom tersebut diduga menjadi penyebab kultivar S-795 terpisah dari kultivar Preanger/Buhun yang sama-sama memiliki tipe pertumbuhan tinggi.

Tabel 4. Matriks jarak genetik dari 12 kultivar kopi Arabika berdasarkan marka SSR
Table 4. Genetic distance matrix of 12 Arabica coffee cultivars based on SSR markers

Kultivar	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
1. ABP-4	0											
2. ABP-2	0,31	0										
3. ABP-3	0,24	0,39	0									
4. AGK-1	0,38	0,23	0,41	0								
5. Sigarar Utang	0,34	0,24	0,29	0,29	0							
6. S-795	0,35	0,31	0,36	**0,44**	0,33	0						
7. Ateng	0,32	0,33	0,24	0,33	0,23	0,43	0					
8. Preanger	0,37	0,36	0,30	0,27	0,29	**0,45**	0,23	0				
9. Buhun LM	0,37	0,33	0,31	0,38	0,41	0,35	0,37	0,37	0			
10. Buhun	0,22	0,25	0,32	0,28	0,22	0,39	0,24	0,19	0,36	0		
11. Andungsari 2K	**0,44**	0,24	0,43	0,31	0,32	0,36	0,30	0,32	0,32	0,33	0	
12. Kartika 1	0,28	0,36	0,26	0,38	0,41	0,41	0,30	0,37	0,32	0,33	0,39	0

Keterangan: Angka-angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai jarak genetik tertinggi
Notes: Numbers with bold typed exhibited the highest genetic distance value

Marka SSR yang menghasilkan pita polimorfik berhasil membedakan hampir semua kultivar kopi Arabika, kecuali kultivar Preanger dan Buhun. Kultivar Preanger dan Buhun tidak dapat dibedakan pada nilai kesamaan genetik 81% karena kemungkinan kedua kultivar tersebut adalah kultivar yang sama hanya mempunyai nama berbeda. Secara keseluruhan, kultivar kopi Arabika yang dievaluasi mempunyai nilai kesamaan genetik 62%–81%. Nilai kesamaan genetik mengindikasikan rendahnya keragaman genetik antar kultivar, dan umumnya memiliki keragaman genetik lebih rendah dibandingkan dengan kopi Robusta. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Geleta *et al.* (2012) dan Lashermes *et al.* (1999) yang menyatakan keragaman genetik dari kopi Arabika lebih rendah jika dibandingkan dengan kopi Robusta, disebabkan oleh basis genetik yang sempit terkait dengan sifatnya menyerbuk sendiri, serta sejarah evolusi dan proses domestikasinya.

Hasil penelitian analisis kekerabatan genetik dengan menggunakan marka SSR sangat bermanfaat dalam mengelompokkan semua kultivar kopi Arabika karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Kultivar kopi Arabika yang mengelompok terpisah dari kultivar lain berpotensi sebagai tetua persilangan karena diasumsikan mempunyai jarak genetik relatif jauh. Tiga kombinasi tetua yang mempunyai nilai jarak genetik lebih tinggi dibandingkan dengan kombinasi lain, yaitu Preanger dengan S-795 (0,45), Andungsari 2K dengan ABP-4 (0,44), dan S-795 dengan AGK-1 (0,44) (Tabel 4). Kombinasi tetua tersebut dapat dipilih sebagai tetua persilangan dengan harapan untuk mendapatkan efek heterosis pada keturunan yang dihasilkan.

Analisis kekerabatan genetik dengan marka SSR terbukti efektif dalam menelusuri asal-usul kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) yang banyak dikembangkan di Garut. Dari hasil dendrogram diketahui bahwa kultivar AGK-1 berkerabat dekat dengan kultivar kopi Arabika berbuah merah, yaitu ABP-2 yang berasal dari Brasil. Secara morfologi, kedua kultivar tersebut juga memiliki banyak persamaan di antaranya adalah mempunyai tipe pertumbuhan semi katai, ruas pendek, dan biji besar. Dengan demikian, kultivar AGK-1 yang berbuah kuning diduga merupakan hasil persilangan bebas dari tetua berbuah merah, termasuk kultivar ABP-2.

KESIMPULAN

Marka SSR dapat mengidentifikasi kekerabatan kultivar kopi Arabika berbuah kuning (AGK-1) dengan 11 kultivar kopi Arabika berbuah merah yang dikembangkan di Kabupaten Garut ke dalam tiga kelompok berbeda pada nilai ambang 66%. Hasil analisis kekerabatan menunjukkan kultivar AGK-1 secara genetik berkerabat dekat dengan kultivar kopi Arabika berbuah merah, yaitu ABP-2 yang berasal dari Brasil dengan tingkat kemiripan 77%. Kultivar AGK-1 diduga merupakan keturunan bersari bebas dari tetua kopi Arabika berbuah merah, terutama kultivar ABP-2. Hal ini didukung oleh persamaan tipe pertumbuhan

antar kedua kultivar tersebut, yaitu memiliki tipe pertumbuhan semi katai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Januar Firmansyah, SP., Tri Buana Dewi dan Mira Sitepu, SSi., yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di laboratorium. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Yoyo Arifin dan Bapak Nurma Nuralam yang telah membantu menyediakan materi tanaman untuk kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Allen, G.C., Flores-Vergara, M.A., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W.F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat Prot, 1,* 2320–2325.

Combes, M.C., Andrzejewski, S., Anthony, F., Bertrand, B., Rovelli, P., Grazios, G., & Lashermes, P. (2000). Characterization of microsatellite loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Molecular Ecology, 9,* 1171–1193.

Geleta, M., Herrera, I., Monzon, A., & Bryngelsson, T. (2012). Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. *The Scientific World Journal* (p. 11).

Izzah, N.K., Lee, J., Perumal, S., Park, J.Y., Ahn, K., Fu, D., Kim, G-B., Nam, Y-W., & Yang, T-J. (2013). Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups. *Genet Resour Crop Evol, 60,* 1967–1986.

Jain, S., Jain, R.K., & McCouch, S.R. (2004). Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor Appl Genet, 109,* 965–977.

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.

Kementerian Pertanian. (2005). *Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 205/Kpts/SR.120/4/2005 tentang pelepasan varietas kopi Sigarar Utang sebagai varietas unggul*. Jakarta.

Kementerian Pertanian. (2010). *Surat Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 1885/Kpts/SR.120/5/2005 tentang pelepasan varietas kopi Andungsari 2K sebagai varietas unggul*. Jakarta.

Kurniasih, S., Rubiyo, Setiawan, A., Purwantara, A., & Sudarsono. (2011). Analisis keragaman genetik plasma nutfah kakao (*Theobroma cacao* L.) berdasarkan markaSSR. *Jurnal Littri, 17*(4), 156–162.

Lashermes, P., Combes, M.C., Trouslot, P., Anthony, F., Hamon, S., & Charrier, A. (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genomics and Genetics, 261,* 259–266.

Liu, K., & Muse, S.V. (2005). PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics, 21,* 2128–2129.

Louarn, S., Torp, A.M., Holme, I.B., Andersen, S.B., & Jensen, B.D. (2007). Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet Resour Crop Evol, 54,* 1717–1725.

Maluf, M.P., Silvestrini, M., Ruggiero, L., M., de C., Filho, O.G., & Colombo, C., A. (2005). Genetic diversity of cultivated Coffea arabica inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR markers system. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz), 62*(4), 366–373.

Missio, R.F., Caixeta, E.T., Zambolim, E.M., Zambolim, L., & Sakiyama, N.S. (2009). Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L.*Crop Breeding and Applied Biotechnology, 9,* 361–371.

Prakash, N.S., Marques, D.V., Varzea, V.M.P., Silva, M.C., Combes, M.C., & Lashermes, P. (2004). Introgression molecular analysis of a leaf rust resistance gene from *Coffea liberica* into *Coffea arabica* L. *Theor. Appl. Genet.*, *109*(6), 1311–1317.

Randriani, E., Dani, & Wardiana, E. (2014). Evaluasi ukuran biji beras, kadar kafein, dan mutu cita rasa lima kultivar kopi Arabika. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar, 1*(1), 49–56.

Rohlf, F.J. (2000). *NTSYS-PC, numerical taxonomy system for the PC, ExeterSoftware, Ver. 2.1*. Setauket: Applied Biostatistics Inc.

Rubiyo, Izzah, N.K., Sulistiyorini, I., & Tresniawati, C. (2015). Genetic diversity in cacao collected from Kolaka, Southeast Sulawesi, using SSR markers. *Indonesian Journal of Agricultural Science* (in press).

Teressa, A., Crouzillat, D., Petiard, V., & Brouhan, P. (2010). Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *Ethiopian Journal of Applied Sciences and Technology, 1*(1), 63–79.

Sera, T., Ruas, P.M., Ruas, C. de F., Diniz, L.E.C., Carvalho, V. de P., Rampim, L., … da Silveira, S.R. (2003). Genetic polymorphism among 14 elite *Coffea arabica* L. cultivars using RAPD markers associated with restriction digestion. *Genetics and Molecular Biology, 26*(1), 59–64.

Zakaria, M.M. (2012). *Coffee Priangan in the nineteenth century*. *Retrieved from* http://pustaka.unpad.ac.id/wp-content/uploads/2012/05/pustaka_unpad_jurnal_historia_coffee_priangan.pdf.