

ANALISIS KERAGAMAN GENETIK KEDELAI INTRODUKSI MENGUNAKAN MARKA MIKROSATELIT

The Genetic Diversity Analysis of Introduced Soybean Cultivars Using Microsatellite Markers

Kristianto Nugroho, Rerenstradika Tizar Terryana, Reflinur, Asadi, Puji Lestari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar No. 3A Cimanggu, Bogor 16111 - Indonesia
Telp. (0251) 8337975 Fax. (0251) 8338820
E-mail: nugrohoxkristianto@gmail.com

(Makalah diterima, 21 Mei 2017 – Disetujui, 06 Desember 2017)

ABSTRAK

Kedelai merupakan komoditas pangan penting selain padi dan jagung. Perakitan dan pengembangan varietas unggul berperan penting dalam meningkatkan produksi. Salah satu sumber daya genetik kedelai yang dapat digunakan dalam perakitan varietas unggul adalah varietas introduksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis keragaman genetik 35 kultivar kedelai introduksi yang berasal dari berbagai negara menggunakan 15 marka mikrosatelit. Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016. Hasil analisis *polymerase chain reaction* (PCR) diberi skor data biner dan dianalisis menggunakan NTSYS dan power marker. Karakter morfologi spesifik setiap kultivar menentukan keragaman genetik. Korelasi positif signifikan diidentifikasi pada beberapa karakter morfologi yang bermanfaat dalam program pemuliaan dengan kombinasi karakter target. Sebanyak 189 alel berhasil dideteksi dengan kisaran 6-23 alel/lokus, rata-rata 12,6 alel/marka. Nilai PIC menunjukkan tingkat polimorfisme berkisar antara 0,76 (GmES1424) hingga 0,95 (Satt100) dengan rata-rata 0,86. Sebanyak 12 marka yang memiliki nilai PIC >0,80 menunjukkan kemampuan dalam mendiskriminasi kultivar kedelai. Frekuensi alel utama rata-rata 21% dengan nilai tertinggi 39% (Satt125) dan terendah 8% (Satt100). Lima marka SSR mampu mendiskriminasi genotipe heterozigot dengan nilai heterozigositas antara 0,41 (SoyF3H) hingga 0,82 (Satt333). Hasil analisis filogenetik menunjukkan 35 kultivar kedelai introduksi memisah menjadi dua kluster utama, masing-masing 13 dan 22 kultivar pada koefisien 0,82 berdasarkan latar belakang genetik. Marka mikrosatelit dan informasi keragaman genetik pada penelitian ini bermanfaat mengarahkan persilangan kedelai dengan memanfaatkan material genetik introduksi.

Kata kunci: kedelai, kultivar introduksi, keragaman genetik, marka mikrosatelit

ABSTRACT

Soybean (Glycine max (L.) Meriil) is an important crop next to rice and corn. The development of improved variety are important to increase national soybean production. The introduced soybean varieties is one of genetic resources that can be used to create improved soybean varieties. The aim of this study was to analyze 35 introduced soybean cultivars using 15 microsatellite markers. The research was conducted in ICABIOGRAD Molecular Biology Laboratory, in January-March 2016. PCR analysis was scored as binary data and the collected data was analyzed using NTSYS and PowerMarker. Specific morphological characters from each soybean cultivar determine the genetic diversity. Significant positive correlations were identified among morphological characters which would be helpful to improve the desired character. The result showed that 189 alleles were detected with average of 12.6 alleles per marker. The polymorphism level (PIC) was 0.86 (0.76-0.95). There were 12 of total markers having PIC>0.80 indicating their robustness to discriminating soybean cultivars. The average major allele frequency was 21% and ranges from 8% (Satt100) to 39% (Satt125). Five SSRs were able to distinguish heterozygosity which varied from 0.41 (SoyF3H) to 0.82 (Satt333). The phylogenetic analyses showed that the 35 introduced soybean cultivars were grouped into two clusters (coefficient of similarity 0.82) consisting of 13 and 22 cultivars according to each genetic background without considering its country origin. Both the microsatellite markers and genetic diversity information in this study could be useful to assist crossing strategy with utilizing introduced genetic materials in future soybean breeding in Indonesia.

Key words: soybean, introduced cultivars, genetic diversity, microsatellite marker

PENDAHULUAN

Kebutuhan kedelai secara nasional rata-rata 2,2 juta ton setiap tahun, sementara produksi dalam negeri baru mampu memenuhi 44,68% (982.967 ton) dan sisanya 53,32% dipenuhi dari impor. Pemerintah terus berupaya meningkatkan produksi untuk mempercepat swasembada kedelai melalui berbagai program, mulai dari perluasan lahan (ekstensifikasi), pengembangan teknologi budi daya yang inovatif, perbaikan infrastruktur pertanian, pengamanan produksi, hingga perbaikan manajemen dan sistem regulasi (Direktorat Jendral Tanaman Pangan, 2015). Salah satu komponen teknologi budi daya yang diperlukan adalah varietas unggul yang dihasilkan melalui persilangan, mutasi iradiasi, pemurnian varietas lokal, dan varietas introduksi (Asadi, 2014).

Di antara varietas unggul yang telah dilepas sejak tahun 1965, sebanyak 14 varietas di antaranya berasal dari introduksi, antara lain varietas Tambora dan Bromo yang berasal dari Filipina, Argomulyo dari Thailand, Dempo dari Kolombia, dan sisanya dari Taiwan (Hermanto *et al.*, 2009). Varietas introduksi yang memiliki daya adaptasi luas, karakter agronomi bagus, dan produksi lebih tinggi potensial dilepas sebagai varietas unggul baru. Selain itu, varietas introduksi juga dapat dimanfaatkan sebagai sumber gen atau tetua dalam persilangan dan memperkaya koleksi plasma nutfah (Asadi, 2014).

Varietas introduksi umumnya memiliki karakter morfoagronomi yang sesuai dengan lingkungan negara asal yang mungkin berbeda dalam hal iklim dan agroekosistem. Untuk mengetahui sifat-sifat yang dimiliki oleh varietas introduksi perlu dilakukan karakterisasi secara morfologi maupun molekuler. Karakterisasi molekuler memiliki keunggulan, yaitu waktu yang dibutuhkan lebih cepat karena tidak perlu menunggu tanaman hingga fase dewasa, tidak bersifat destruktif, mampu membedakan individu berkerabat dekat, dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Pandin, 2009; Yono *et al.*, 2017). Informasi karakterisasi molekuler dapat digunakan bersama dan saling melengkapi dengan data karakter morfologi (Santoso *et al.*, 2006). Mikrosatelit atau Simple Sequence Repeat (SSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang banyak dimanfaatkan dalam karakterisasi secara molekuler. Mikrosatelit umumnya didisain berdasarkan pengulangan basa sebanyak 1-5 pasang yang dapat ditemukan secara luas pada sikuen DNA eukariotik (Novelli *et al.*, 2013). Kelebihan marka ini adalah bersifat kodominan, berbasis PCR, reproduksibilitas tinggi, dan mampu mendeteksi lokus polimorfik secara akurat (Chawla, 2002; Varshney *et al.*, 2004). Dalam bidang pertanian, marka ini banyak diaplikasikan dalam karakterisasi material genetik, seleksi tanaman, analisis sidik jari DNA, dan pemetaan genetik terkait karakter kuantitatif tertentu (Madesis *et al.*, 2013).

Penggunaan marka mikrosatelit dalam menganalisis keragaman genetik tanaman telah banyak dilakukan, antara lain pada tanaman tomat (Bredemeijer *et al.*, 2002); kentang (Ghislain *et al.*, 2004); kelapa sawit (Tasma *et al.*, 2013); jarak pagar (Saptadi *et al.*, 2011); dan mangga (Tasliyah *et al.*, 2013). Marka ini juga dapat dimanfaatkan sebagai alternatif uji BUSS (Baru, Unik, Seragam, dan Stabil) dalam perlindungan varietas tanaman (Moeljopawiro, 2010). Banyak kelompok peneliti di berbagai negara telah memanfaatkan marka mikrosatelit dalam analisis dan pemetaan genetik kedelai (Diwan dan Cregan, 1997; Wang *et al.*, 2005; Mulato *et al.*, 2010; Tyagi dan Seti, 2011; Bisen *et al.*, 2015). Di Indonesia, marka molekuler juga telah dimanfaatkan untuk karakterisasi kedelai (Arisetyaningsih *et al.*, 2010; Wirnas *et al.*, 2011; Wiradjaja, 2012). Di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), marka mikrosatelit telah dimanfaatkan sejak 2004 (Septiningsih *et al.*, 2004; Santoso *et al.*, 2006; Chaerani *et al.*, 2011; dan Risliawati *et al.*, 2015).

Koleksi kedelai introduksi di bank gen BB Biogen perlu dikarakterisasi secara molekuler untuk percepatan pemanfaatannya dalam perakitan varietas unggul. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik 35 kultivar kedelai introduksi menggunakan 15 marka mikrosatelit. Data keragaman genetik yang diperoleh diharapkan bermanfaat dalam program pemuliaan kedelai.

BAHAN DAN METODE

Materi Genetik

Sebanyak 35 kultivar kedelai introduksi yang berasal dari Amerika Serikat, Kanada, Rusia, Swedia, dan Jepang digunakan dalam penelitian ini (Tabel 1). Kultivar tersebut dipilih karena dapat dijadikan materi genetik potensial dalam program perakitan varietas dan memperluas keragaman genetik kedelai di Indonesia. Kultivar-kultivar tersebut ditanam di Kebun Percobaan Muara, Bogor, Jawa Barat. Daun muda dan sehat dipanen dari tanaman berumur satu bulan untuk ekstraksi DNA genomik. Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen sejak bulan Januari hingga Maret 2016.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi. Bahan-bahan pembuatan buffer ekstraksi terdiri atas 2% (w/v) CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*), 100 mM Tris-HCl pH

Tabel 1. Kultivar kedelai introduksi koleksi BB Biogen yang digunakan pada penelitian. Kebun Percobaan Muara, Bogor, Jawa Barat

| Sampel | Kode aksesori | Kultivar | Asal | Maturity group | Warna bunga | Warna polong | Warna Kulit Biji | Warna Bulu | Tipe Pertumbuhan Batang |
|--------|---------------|-------------------------|----------------------|----------------|-------------|--------------|------------------|--------------|-------------------------|
| Obs1 | PI092460 | Unknown | Rusia | Group II | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs2 | PI591435 | OT94-41; Harosoy_e4 | Kanada | Group I | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs3 | PI548523 | Pella | Iowa, AS | Group III | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs4 | PI085878 | Karihatakiya no. 28 | Jepang | Group III | Putih | Cokelat muda | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs5 | PI084976 | 3447 | Jepang | Group III | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs6 | PI567283 | Shirojisi | Jepang | Group 00 | Putih | Cokelat | Hijau | Cokelat muda | Determinate |
| Obs7 | PI547428 | L65-763 | Illinois, AS | Group IV | Ungu | Cokelat muda | Hijau | - | Indeterminate |
| Obs8 | PI561573 | D90-9216 | Mississippi, AS | Group VI | Putih | Cokelat | Kuning | - | Determinate |
| Obs9 | PI506476 | A100 | Jepang | Group II | Putih | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs10 | PI547425 | L64-1344 | Illinois, AS | - | - | - | - | - | - |
| Obs11 | PI196529 | 770-3 | Ostergotland, Swedia | Group 000 | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | |
| Obs12 | PI546043 | OT89-05 | Ontario, Kanada | Group 000 | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs13 | PI546044 | OT89-06 | Ontario, Kanada | Group 000 | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs14 | PI297550 | Urozsajnaja | Rusia | Group 0 | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs15 | PI317336 | Shinsei | Hokkaido, Jepang | Group 0 | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Semi-determinate |
| Obs16 | PI591433 | OT94-37; Harosoy_e3 | Ontario, Kanada | Group 0 | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs17 | PI092468 | Xapsunchoe Onormnoe | Rusia | Group I | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs18 | PI086031 | Koshurei Marugata Daizu | Jepang | Group II | Putih | Cokelat | Hitam | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs19 | PI086454 | Shokuroheso | Jepang | Group II | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs20 | PI547716 | L62-667 | Illinois, AS | Group II | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs21 | PI547729 | L67-153 | Illinois, AS | Group II | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs22 | PI548573 | Harosoy | Ontario, Kanada | Group II | Ungu | Cokelat | Kuning | Abu-abu | Indeterminate |
| Obs23 | PI086153 | Hongoku | Shizuoka, Jepang | Group III | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Determinate |
| Obs24 | PI086449 | Shiheigo Kuroheso | Akito, Jepang | Group III | Putih | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs25 | PI171450 | Kisaya | Kagoshima, Jepang | Group III | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Cokelat muda | Determinate |
| Obs26 | PI438501 | Wilson | USA | Group III | Ungu | Cokelat | Hitam | Abu-abu muda | Indeterminate |
| Obs27 | PI085903 | 3740 | Iwate, Jepang | Group IV | Putih | Cokelat | Hijau | Abu-abu | Determinate |
| Obs28 | PI086876 | Daizu Pikuanda | Okinawa, Jepang | Group IV | Putih | Cokelat muda | Kuning | Cokelat muda | Determinate |

Tabel 1. Kultivar kedelai introduksi koleksi BB Biogen yang digunakan pada penelitian. Kebun Percobaan Muara, Bogor, Jawa Barat (lanjutan)

| Sampel | Kode akses | Kultivar | Asal | Maturity group | Warna bunga | Warna polong | Warna Kulit Biji | Warna Bulu | Tipe Pertumbuhan Batang |
|--------|------------|-----------------|---------------|----------------|-------------|--------------|------------------|---------------|-------------------------|
| Obs29 | PI171454 | Kurosakigake | Tokyo, Jepang | Group IV | Ungu | Cokelat | Hitam | Cokelat muda | Determinate |
| Obs30 | PI507265 | Shiro hachikoku | Jepang | Group IV | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Abu-abu | Determinate |
| Obs31 | PI518771 | HC83-123-9 | Ohio, AS | Group IV | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Determinate |
| Obs32 | PI547492 | L67-3480 | Illinois, USA | Group IV | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs33 | PI200485 | Keburi | Jepang | Group III | Ungu | Cokelat muda | Kuning | Tidak berbulu | Determinate |
| Obs34 | PI547747 | L71-802 | Illinois, AS | Group II | Ungu | Cokelat | Kuning | Cokelat muda | Indeterminate |
| Obs35 | PI559366 | L86K-96 | Maryland, AS | - | - | - | - | - | - |

8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 2% (w/v) PVP (*Polyvinylpyrrolidone*), dan 0,3% (w/v) natrium disulfid. Sebanyak 100 mg daun kedelai dari tiap sampel digerus dengan *blue pestle* steril pada tabung Eppendorf 2 ml yang diberi *buffer* ekstraksi hingga 800 µl. Selanjutnya ke dalam tiap sampel dimasukkan β-merkaptotanol sebanyak 2 µl. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65°C dalam *water bath* selama 30 menit dan dihomogenisasi dengan cara dibolak-balik setiap 10 menit. Setelah inkubasi ditambahkan 800 µl kloroform-isoamil alkohol (24:1) ke setiap tabung. Campuran lalu dihomogenkan dengan cara dibolak-balik selama 3 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C.

Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml, diikuti penambahan natrium asetat 3M pada pH 5,2 sebanyak 60 µl dan isopropanol dingin 600 µl. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Pelet DNA yang terbentuk dicuci menggunakan 500 µl etanol 70%, kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu 20°C. DNA yang telah bersih dikeringanginkan untuk menghilangkan sisa etanol. DNA yang telah kering dilarutkan dalam 100 µl larutan TE (10 mM Tris pH 8,0 dan 1 mM EDTA) dan ditambahkan RNase (10 mg/ml) sebanyak 2 µl. Larutan DNA stok tersebut kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dan disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

Larutan DNA stok kedelai tersebut diuji secara kuantitatif dan kualitatif untuk mengetahui konsentrasi dan tingkat kemurniannya. Uji kuantitatif menggunakan nanodrop spektrofotometer (ThermoScientific, USA), sementara

uji kualitatif menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarose 1% pada tangki berisi bufer 1x TAE (*Tris-Acetate-EDTA*), dengan tegangan 90 Volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah sinar UV dalam alat UV *Transilluminator*.

Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dalam total volume 10 µl yang terdiri atas 10 ng DNA *template* sebanyak 1 µl; Kapa2G Fast ReadyMix (Kapa Biosystems, USA) 5 µl; 10 µM primer Forward dan Reverse masing-masing 0,5 µl, dan ddH₂O steril. Sebanyak 15 pasang marka mikrosatelit berdasarkan literatur dari Widaningsih *et al.* (2014) digunakan dalam penelitian ini (Tabel 2). Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR *T1 Thermocycler* (Biometra, Germany) dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 35 siklus proses denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, *annealing* (tahap penempelan primer) pada suhu 52°C selama 15 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 15 detik. Reaksi PCR diakhiri dengan siklus *final extension* (tahap akhir perpanjangan basa) pada suhu 72°C selama 1 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 8% pada tangki berisi bufer 1x TBE (*Tris-Borate-EDTA*) dengan tegangan 90 Volt selama 100 menit.

Analisis Data

Karakter morfologi setiap kultivar kedelai dieksplorasi dari database plasma nutfah USDA (www.ars-grin.gov/). Karakter morfologi yang dianalisis meliputi

Tabel 2. Marka mikrosatelit yang digunakan pada penelitian ini (Widaningsih *et al.*, 2014)

| Nama primer | Karakter | Urutan sekuen |
|-------------|-------------------------------|--|
| GmF35H | Warna bunga | F-TAGAAAGCACCCCTTCAACAC R-TTTATGTAGCCACAGCCACA |
| SoyF3H | Warna pubescence | F-GTCATAAAAATATCATTATTATTATATCTATTAA R-CACTCCCAAAAAGCTTTTAAGTGT |
| Sat_286 | Tipe pertumbuhan | F-GCGTTGCTTGCTAAGTAGTGTTTTTTAATCCT R-GCGTCTCCCATCATGCAACTTCAATA |
| GMES1173 | Warna polong | F-TATGGGACATCAAAGCCACA R-CGCACTGCCATATGAAGAGA |
| Satt288 | Ketahanan terhadap karat daun | F-GCGGGGTGATTTAGTGTGGACACCT R-GCGCTTATAATTAAGAGCAAAAAGA |
| Satt125 | Warna kulit biji | F-CAAATAAAAACATATACCTCTTGT R-TGCCTTACTCTACTCTGTTTC |
| Satt100 | Warna kulit biji | F- ACCTCATTTTGGCATAAA R- TTGAAAACAAGTAATAATAACA |
| Satt333 | Warna kulit biji | F- GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA R- GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT |
| GMES0216 | Marka universal | F-CCGGGACAGGGTTTCTAACT R-CCGAAGAAGACGACGAAATC |
| GMES2225 | Marka universal | F-CCTCCTAATGAGGCCAATGA R-ATTATCCGGCCAAACTTCC |
| GAAT47 | Marka universal | F-TGTCCATGTTTAGTGATGAGGC R-CTGTTGTGATCGGAAGGTGTAG |
| GMES1604 | Marka universal | F-GTTGCAGGCACACTGGAGTA R-CTCAGCCTTCTTCCCTGTTG |
| GATT43 | Marka universal | F-AAAATCGTATTCTTCTTCCCA R-GATTGGGTAATTGTTGGAGAAA |
| GMES1424 | Marka universal | F-TCTTCGGTGTGCAATCAAG R-ACAACCTTCAAACCTGGCTGG |
| GMES3515 | Marka universal | F-ATGGTGTGCAAGAACCTTCC R-TCCGGAAGAGATTGAGTGTG |

Tabel 3. Interval kekuatan hubungan korelasi menurut Sarwono (2009)

| Interval | Level korelasi |
|-----------|-----------------------|
| 0,00 | Tidak ada korelasi |
| 0,00-0,25 | Korelasi sangat lemah |
| 0,25-0,50 | Korelasi cukup |
| 0,50-0,75 | Korelasi kuat |
| 0,75-0,99 | Korelasi sangat kuat |
| 1,00 | Korelasi sempurna |

grup *maturity*, warna bunga, warna polong, warna biji dan kulit biji, serta tipe pertumbuhan. Matrik korelasi antarkarakter morfologi dilakukan secara statistik, dan pengelompokan berdasarkan saran Sarwono (2009) seperti tercantum pada Tabel 3. Setiap data morfologi yang diseleksi dikonversi terlebih dahulu ke dalam bentuk angka berdasarkan nilai skor tertentu, misal untuk warna bunga ungu diberi skor 1 dan untuk warna bunga putih diberi skor 2. Analisis PCA (*Principal Component*

Analysis) dilakukan berdasarkan data morfologi menggunakan perangkat lunak XLSAT. Jumlah kultivar yang dianalisis berdasarkan nomor observasi tercantum pada Tabel 1. Kultivar yang tidak memiliki data fenotipe lengkap seperti L65-763, D90-9216, L64-1344, dan L86K-96 tidak diikutsertakan dalam analisis.

Analisis data molekuler dilakukan dengan metode skoring terhadap pita DNA hasil PCR yang muncul pada elektroforesis gel poliakrilamid 8%. Pita-pita yang

terlihat dianggap sebagai satu alel. Pita-pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama dianggap sebagai lokus yang sama. Pada laju migrasi yang sama, setiap pita yang terlihat diberi skor 1, pita yang tidak terlihat diberi skor 0. Sampel yang tidak teramplifikasi diberi skor 9 dan dianggap sebagai data yang hilang, sehingga hasil skoring pita berupa data biner. Untuk mempermudah penentuan posisi pita, kegiatan skoring dibantu dengan perangkat lunak Gel Analyzer (Lazar, 2010).

Data hasil skoring selanjutnya dianalisis menggunakan program *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic (UPGMA)- Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested (SAHN)* pada perangkat lunak NTSYS versi 2,1. (Rohlf, 2000). Hasil analisis filogenetik disajikan dalam bentuk dendrogram. Selanjutnya data hasil skoring dianalisis menggunakan perangkat lunak PowerMarker 3,25 (Liu dan Muse, 2005) untuk mengetahui statistika seperti nilai frekuensi alel utama, diversitas genetik, heterozigositas, dan PIC (*Polymorphism Information Content*) yang dihasilkan oleh marka-marka yang digunakan pada penelitian.

Nilai PIC dihitung menurut formulasi Hildebrand *et al.* (1992) sebagai berikut:

$$PIC_j = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

PIC j adalah nilai *Polymorphism Information Content* marka ke-j, adalah frekuensi alel ke-i pada marka ke-j, dan n adalah jumlah alel pada marka ke-j.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Morfologi Kedelai Introduksi

Kedelai introduksi yang diteliti cukup beragam dari segi karakter morfologi, terutama warna bunga, warna polong, warna biji, dan kulit biji. Sebagian besar kultivar berbunga ungu dan hanya delapan kultivar yang memiliki bunga berwarna putih (7 dari Jepang, 1 dari Amerika Serikat). Berdasarkan pertumbuhan batang, proporsi kultivar yang indeterminate dan determinate seimbang dan hanya sebagian kecil yang semideterminate yang diketahui berasal dari Swedia (770-3) dan Jepang (Shinsei). Sebagian kultivar memiliki warna polong cokelat, warna kulit biji kuning, dan sebagian kecil yang berwarna hitam dan kulit bijinya hijau. Selain kultivar Keburi (Jepang) yang tidak bijinya berbulu, proporsi warna bulu abu-abu dan cokelat muda hampir seimbang antarkedelai introduksi.

Karakter warna dan tipe biji kedelai koleksi menggambarkan potensinya sebagai model tanaman yang secara genetik berkontribusi dalam penentuan variasi fenotipe (Corte *et al.*, 2010). Melengkapi karakter

morfologi tersebut, informasi grup maturity kedelai introduksi menunjukkan variasi yang tinggi, dari 000 sampai VI, yang merefleksikan kelompok berdasarkan kondisi iklim dan letak astronomis (Gore *et al.*, 2006). Di Amerika Serikat, varietas kedelai dalam grup maturity V, VI, dan VII biasanya ditanam di daerah yang berlainan sehingga semakin meyakinkan perbedaan wilayah dan waktu penanaman dari tiap grup maturity (Gore *et al.*, 2006). Setiap kultivar kedelai dalam penelitian ini juga tidak menunjukkan spesifik morfologi, baik bunga dan biji maupun polong, sesuai dengan negara asal yang berbeda. Sifat determinate yang memudahkan panen dan karakter biji yang dominan dari materi genetik introduksi membantu memudahkan pemulia dalam uji adaptasi dan seleksi tetua persilangan (Khamassi *et al.*, 2014).

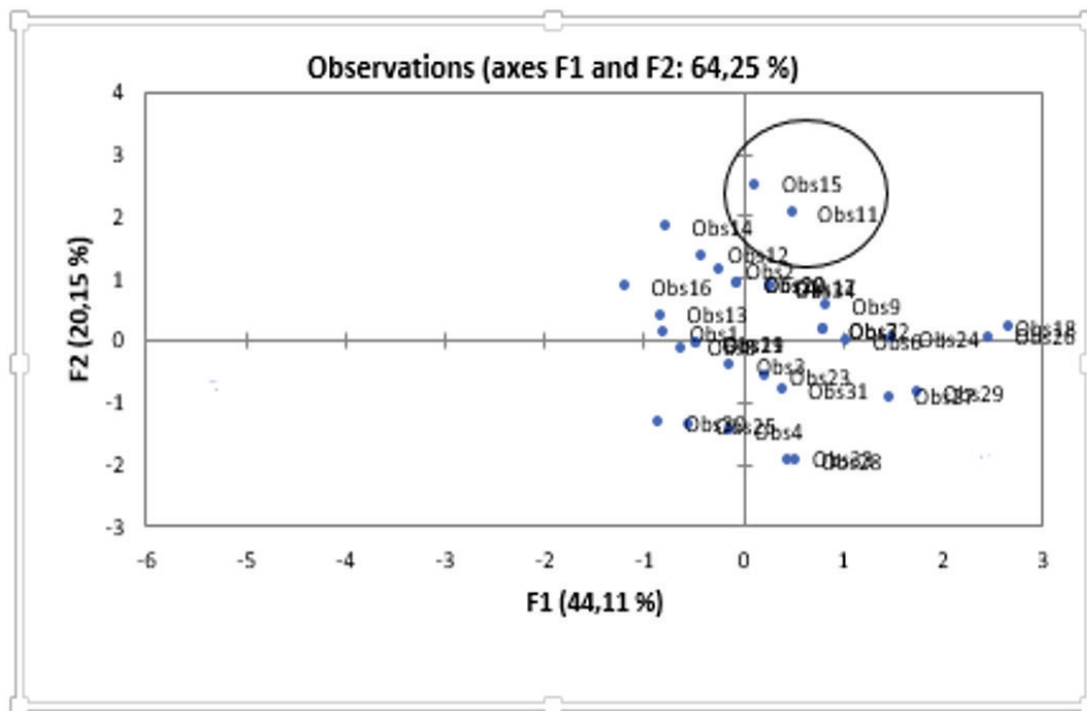
Berdasarkan matriks korelasi Pearson (Tabel 4), korelasi positif signifikan ditemukan antargrup maturity dengan skor warna bunga 0,456 dan skor warna pubescence 0,491, tipe pertumbuhan dengan warna polong 0,508, warna bunga dengan warna polong 0,393, warna pubescence 0,351, warna kulit biji 0,429, warna polong dengan warna kulit biji 0,454, antara warna pubescence dan warna kulit biji 0,372. Sebagai contoh, kultivar dengan maturity group II (L62-667, L67-153, L71-802, PI 092460, Harosoy, dan Shokuroheso) cenderung memiliki warna bunga ungu. Kultivar dengan tipe pertumbuhan indeterminate (OT89-05, Xapsunchoe Onormnoe, Koshurei Marugata Daizu, L62-667, Harosoy, dan Shiheigo Kuroheso) cenderung memiliki warna polong yang sama yaitu cokelat. Sementara kultivar berbunga ungu tidak semuanya memiliki polong berwarna cokelat, namun beberapa kultivar memiliki warna polong cokelat muda seperti Pella dan 3447.

Sebagai informasi, berdasarkan interval korelasi Sarwono (2009) pada Tabel 3, korelasi antara warna bunga dengan warna polong bersifat cukup. Begitu pula hubungan antara warna bunga dengan warna bulu dengan nilai korelasi termasuk cukup, sehingga tidak semua kultivar dengan warna bunga sama akan memiliki warna bulu yang sama. Nilai korelasi positif dari total kultivar kedelai pada penelitian ini memudahkan dalam memaksimalkan perbaikan genetik kedelai melalui persilangan dan introgresi karakter target yang dapat difokuskan pada karakter biji, polong, maupun maturity. Selain itu, keragaman genetik kedelai yang umumnya rendah di Indonesia, dapat diperkaya dengan kedelai introduksi yang diketahui memiliki variasi morfologi cukup tinggi dan sebagai sumber pemuliaan yang memerlukan seleksi (Baranek *et al.*, 2002; Mahbub *et al.*, 2016).

Hubungan antara 35 kultivar kedelai introduksi berdasarkan karakter morfologi melalui analisis PCA dalam kluster disajikan pada Gambar 1. Tiap kultivar cenderung menyebar dalam empat kuadran dan

Tabel 4. Matriks korelasi Pearson berdasarkan karakter kualitatif 35 kultivar kedelai introduksi. Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016

| Variabel | Maturity group | Tipe pertumbuhan | Warna bunga | Warna polong | Warna pubescence |
|------------------|----------------|------------------|---------------|---------------|------------------|
| Maturity group | 1 | | | | |
| Tipe pertumbuhan | 0,031 | 1 | | | |
| Warna bunga | 0,456* | 0,156 | 1 | | |
| Warna polong | 0,179 | 0,508* | 0,393* | 1 | |
| Warna pubescence | 0,491* | 0,200 | 0,351* | 0,294 | 1 |
| Warna kulit biji | 0,333 | 0,184 | 0,429* | 0,454* | 0,372* |



Gambar 1. Analisis PCA 35 kultivar kedelai berdasarkan karakter morfologi. Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016

overlap karakter morfologi, relevan dengan laporan analisis kedelai dari Bangladesh (Mahbub *et al.*, 2016). Sementara kultivar dengan nomor observasi 11 dan 15, yaitu kultivar 770-3 asal Swedia dan Shinsei asal Jepang, cenderung mengelompok. Hal ini diduga karena keduanya memiliki tipe pertumbuhan batang yang sama, yaitu semideterminate. Secara umum, hasil klusterisasi dengan perbedaan antarkultivar dan kelompok dalam penelitian ini diperlukan untuk meningkatkan efektivitas program perbaikan genetik, karena variasi hasil PCA dapat membantu program pemuliaan menjadi lebih terarah. Didukung oleh informasi fenotipe yang lengkap maka progeni yang dihasilkan lebih sesuai dengan karakter yang diinginkan dan lebih prospektif dikembangkan (Rahman *et al.*, 2011; Salimi *et al.*, 2012; Mahbub *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015).

Polimorfisme Alel Mikrosatelit

Sebanyak 189 alel berhasil dideteksi pada 35 kultivar kedelai introduksi menggunakan 15 marka mikrosatelit. Alel dideteksi berdasarkan amplicon seperti ditampilkan pada Gambar 2. Jumlah alel yang berhasil dideteksi lebih banyak dibandingkan dengan hasil penelitian Santoso *et al.* (2006) yang memperoleh 116 alel dan Chaerani *et al.* (2011) mendeteksi 86 alel. Pada penelitian ini, jumlah alel per marka rata-rata 12,6, lebih banyak daripada hasil penelitian Abe *et al.* (2003) dengan nilai 11,9 alel/marka, namun lebih rendah dibanding hasil penelitian Guan *et al.* (2010) yang memperoleh rata-rata 16,2 alel/marka.

Pada penelitian ini diperoleh 6-23 alel/lokus, sedangkan Risliawati *et al.* (2015) memperoleh 4-25 alel/lokus. Banyaknya jumlah alel pada penelitian ini diduga

karena beragamnya kultivar yang digunakan. Ringkasan statistik polimorfisme marka ditampilkan pada Tabel 5.

Nilai diversitas gen yang diperoleh berkisar antara 0,79 (Satt125 dan GmES1424) hingga 0,95 (Satt100) dengan rata-rata 0,87. Santoso *et al.* (2006) memperoleh nilai diversitas gen berkisar antara 0,56-0,86 dengan rata-rata 0,74. Widaningsih *et al.* (2014) memperoleh nilai diversitas gen antara 0,24-0,83 dengan rata-rata 0,66. Sementara nilai PIC yang menunjukkan tinggi rendahnya tingkat polimorfisme berkisar antara 0,76 (GmES1424) hingga 0,95 (Satt100) dengan rata-rata 0,86. Nilai diversitas gen dan PIC berkorelasi secara langsung di mana nilai PIC umumnya sedikit lebih rendah dibanding nilai diversitas gen (Widaningsih *et al.*, 2014). Selaras dengan jumlah alel yang tinggi, nilai PIC mencerminkan tingkat polimorfisme (Tasliyah *et al.*, 2013). Diversitas gen total kedelai introduksi yang berasal dari negara subtropik (Amerika Serikat, Jepang, Swedia, Rusia, dan Kanada) juga lebih tinggi daripada diversitas gen koleksi kedelai gabungan dari negara di Asia maupun Amerika (Zhang *et al.*, 2013; Kumawat *et al.*, 2015).

Meskipun ada perbedaan kriteria penetapan nilai PIC yang menunjukkan marka informatif (Botstein *et al.*, 1980; Hildebrand *et al.*, 1992), nilai PIC tiap marka dan total marka dalam penelitian ini menunjukkan tingkat informatif yang tinggi. Menurut Botstein *et al.* (1980), marka dengan PIC>0,5 termasuk kategori sangat informatif, sedangkan marka dengan PIC<0,25 kurang

informatif. Hildebrand *et al.* (1992) membuat kriteria marka dengan PIC>0,7 sangat informatif dan sebaliknya. Marka yang informatif memiliki nilai PIC>0,75 (Chaerani *et al.*, 2011) namun marka informatif sebaiknya dengan PIC>0,80 (Risliawati *et al.*, 2015). Mengacu pada kriteria Botstein *et al.* (1980), seluruh marka yang digunakan dalam penelitian ini dengan PIC>0,5 bersifat informatif dan mampu membedakan kultivar kedelai. Berdasarkan PIC>0,80 (Risliawati *et al.*, 2015), terdapat 12 marka yang bersifat informatif, kecuali Satt115, GmES1424, dan GmES0216. Jumlah marka informatif pada penelitian ini lebih banyak dari hasil penelitian Chaerani *et al.* (2011) yang hanya memperoleh empat marka informatif dari 10 marka SSR dan Risliawati *et al.* (2015) memperoleh empat marka informatif dari 14 marka SSR.

Frekuensi alel utama yang diperoleh rata-rata 21% dengan nilai tertinggi 39% pada marka Satt125 dan terendah 8% pada marka Satt100. Nilai heterozigositas menurut Chaerani *et al.* (2011) merefleksikan peluang terambilnya dua alel secara acak dari populasi yang menunjukkan keragaman. Terdapat lima marka SSR yang mampu mendiskriminasi genotipe heterozigot dengan nilai heterozigositas berkisar antara 0,41 (SoyF3H) hingga 0,82 (Satt333). Sebagai tanaman yang menyerbuk sendiri, kedelai cenderung memiliki heterozigositas rendah, namun koleksi kedelai yang berasal dari berbagai negara ini, termasuk kedelai lokal Jepang dan Amerika Serikat, sangat mungkin memiliki tingkat heterozigositas

Tabel 5. Jumlah alel, frekuensi alel utama, diversitas gen, tingkat polimorfisme (*polymorphism information content* - PIC), dan heterozigositas dari 35 kultivar kedelai introduksi. Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016

| Primer | Jumlah alel | Rentang ukuran alel (bp) | Frekuensi alel utama | Diversitas gen | PIC | Heterozigositas |
|------------------|-------------|--------------------------|----------------------|----------------|-------------|-----------------|
| GmF35H | 19 | 461-656 | 0,21 | 0,92 | 0,91 | 0 |
| SoyF3H | 11 | 186-238 | 0,19 | 0,89 | 0,88 | 0,41 |
| Sat_286 | 15 | 137-224 | 0,16 | 0,91 | 0,90 | 0,74 |
| GmES1173 | 10 | 156-211 | 0,26 | 0,87 | 0,85 | 0 |
| Satt125 | 8 | 175-227 | 0,39 | 0,79 | 0,77 | 0 |
| Satt333 | 23 | 167-302 | 0,10 | 0,94 | 0,94 | 0,82 |
| Satt288 | 15 | 183-268 | 0,14 | 0,92 | 0,91 | 0 |
| Satt100 | 23 | 124-241 | 0,08 | 0,95 | 0,95 | 0,73 |
| GmES0216 | 6 | 120-147 | 0,26 | 0,80 | 0,77 | 0 |
| GmES2225 | 11 | 227-269 | 0,17 | 0,89 | 0,88 | 0 |
| GAAT47 | 8 | 122-169 | 0,25 | 0,85 | 0,83 | 0 |
| GmES1604 | 8 | 327-380 | 0,23 | 0,83 | 0,81 | 0 |
| GATT43 | 11 | 306-389 | 0,30 | 0,84 | 0,82 | 0 |
| GmES1424 | 6 | 185-234 | 0,29 | 0,79 | 0,76 | 0 |
| GmES3515 | 15 | 251-327 | 0,20 | 0,89 | 0,88 | 0,58 |
| Jumlah | 189 | | | | | |
| Rata-rata | 12,6 | | 0,21 | 0,87 | 0,86 | 0,22 |

yang tinggi secara fenotipik tetapi tidak terlihat akibat pengaruh lingkungan (Zhang *et al.*, 2013).

Analisis Filogenetik

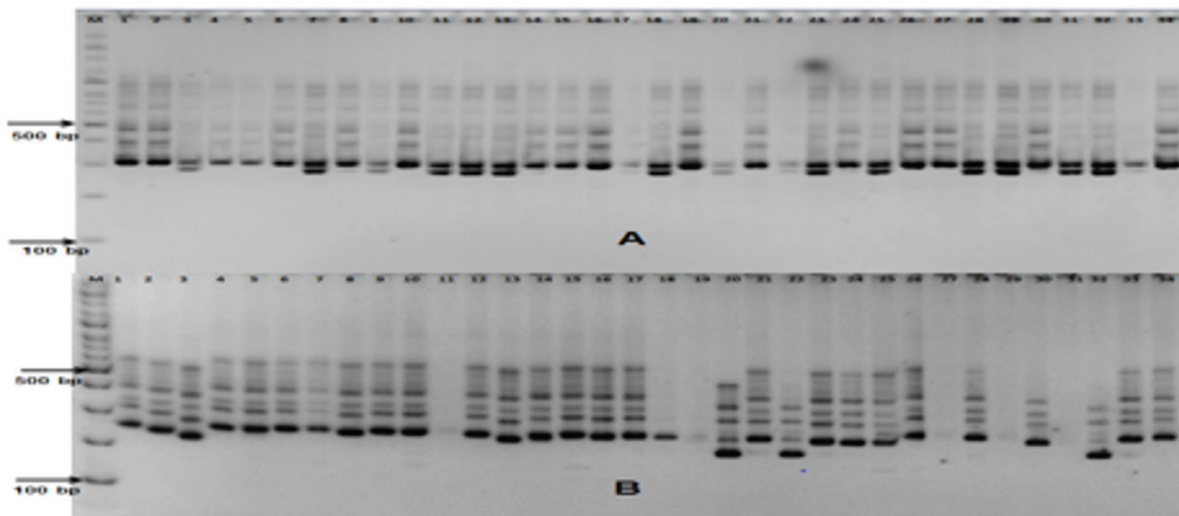
Hasil analisis filogenetik menunjukkan 35 kultivar kedelai introduksi memisah menjadi dua klaster utama pada koefisien 0,82 masing-masing 13 kultivar pada klaster I dan 22 kultivar pada klaster II (Gambar 2). Kultivar asal Rusia mengelompok pada klaster II, kecuali PI092460. Begitu pula kultivar asal Kanada yang sebagian besar berada pada klaster II, kecuali OT94-41 pada klaster I. Kultivar asal Jepang yang mengelompok pada klaster I adalah Karihatakiyano No. 28, Shirojisi, 3447, dan A100, sedangkan sebagian besar (13 kultivar) berada pada klaster II. Kultivar asal Amerika Serikat hampir separuhnya terdapat pada kedua klaster.

Berdasarkan pengelompokan kultivar kedelai menggunakan marka mikrosatelit ternyata didukung oleh karakter morfologi. Sebagai contoh, berdasarkan warna bunga pada klaster I, kultivar-kultivar berbunga putih (Karihatakiyano No. 28, Shirojisi, 3447, dan A100) mengelompok pada subklaster yang sama pada B(i) sebagaimana terlihat pada Gambar 3. Pada klaster II, kultivar-kultivar berbunga putih (Shiheigo Kuroheso, Daizu Pikuanda, dan 3740) berada pada subklaster B(i). Kultivar Koshurei Marugata Daizu memisah sendiri pada subklaster A(ii). Pada klaster I, kultivar dengan polong berwarna cokelat muda (Pella, Karihatakiyano No. 28, 3447, dan Keburi) menempati subklaster B(i), kecuali kultivar PI092460 asal Rusia yang berada pada subklaster A(i). Pada klaster II, kultivar dengan polong berwarna cokelat muda (Kisaya, Daizu Pikuanda, dan Shiro Hachikoku) mengelompok pada subklaster B(i).

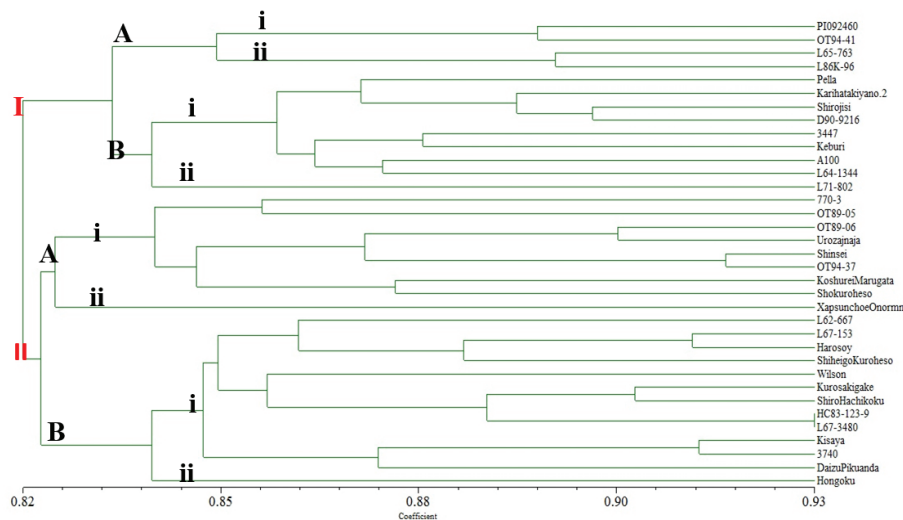
Pengelompokan berdasarkan warna bulu tidak memperlihatkan pola tertentu, di mana kultivar dengan warna bulu cokelat muda bercampur dengan kultivar berwarna abu-abu. Pengelompokan berdasarkan warna kulit biji memperlihatkan pola pada warna kulit biji hitam, namun tidak pada warna hijau. Kultivar Shirojisi dan 3740 yang memiliki warna kulit biji hijau masing-masing berada pada klaster berbeda, sedangkan kultivar dengan warna kulit biji hitam (Koshurei Marugata Daizu, Wilson, dan Kurosakigake) cenderung mengelompok pada klaster II. Demikian pula kultivar dengan pertumbuhan batang determinate dan indeterminate, tersebar pada kedua klaster sementara kultivar dengan pola pertumbuhan semideterminate (770-3 dan Shinsei) berada klaster kedua subklaster A(i).

Karakter morfologi dipengaruhi oleh lingkungan dan terbatas penggunaannya untuk analisis keragaman genetik. Karakterisasi molekuler yang reproduibel dan tersebar pada genom membantu efisiensi dalam analisis kultivar kedelai, meskipun dengan dasar genetik sempit (Kumawat *et al.*, 2015). Kultivar kedelai introduksi dikelompokkan tidak berdasarkan negara asal, namun menurut latar belakang genetik setiap individu.

Terdapat dua kultivar yang memiliki kekerabatan paling dekat, yaitu HC83-129 dan L67-3480 dengan nilai koefisien kesamaan genetik 0,942. Artinya, terdapat 94,2% kesamaan genetik di antara kedua kultivar tersebut dengan perbedaan hanya 5,8%. Kedua kultivar berasal dari Amerika Serikat dan tidak disarankan dijadikan sebagai tetua persilangan karena dapat menyebabkan inbreeding, namun dapat dijadikan sebagai tetua persilangan dengan varietas lainnya, selama jarak genetiknya cukup jauh. Hal ini menunjukkan keefektifan marka mikrosatelit dalam menentukan variasi genetik kultivar kedelai introduksi



Gambar 2. Pola pita hasil elektroforesis sampel kedelai introduksi pada gel poliakrilamid 8% yang diamplifikasi menggunakan marka A) GMES3515 dan B) Satt288 (Keterangan: M: DNA Ladder 100 bp). Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016



Gambar 3. Dendrogram 35 kultivar kedelai introduksi berdasarkan 15 marka SSR menggunakan program UPGMA dengan perangkat lunak NTSYS. Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen, Januari-Maret 2016

yang berasal dari berbagai negara dengan agroekosistem yang sangat berbeda, sejalan dengan hasil analisis sebelumnya walaupun kultivar yang digunakan berbeda (Zhou *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2009; Kumawat *et al.*, 2015). Hasil analisis keragaman genetik kultivar kedelai pada penelitian ini dapat menjadi dasar dalam karakterisasi plasma nutfah kedelai yang ada dan memberi informasi tentang pemanfaatan dan seleksi pada program pemuliaan kedelai ke depan.

KESIMPULAN

Keragaman genetik 35 kultivar kedelai introduksi dapat diidentifikasi berdasarkan marka morfologi berupa bunga, polong, biji, grup maturity, dan tipe pertumbuhan. Analisis keragaman genetik 35 kultivar kedelai introduksi berdasarkan 15 marka mikrosatelit menunjukkan pengelompokan menjadi dua kluster utama pada koefisien kemiripan genetik 0,82. Pengelompokan kultivar kedelai tidak berdasarkan negara asal, namun menurut latar belakang genetik dengan karakter morfologi tertentu. Sebanyak 12 dari 15 marka yang digunakan menunjukkan tingkat polimorfisme yang tinggi dan dapat digunakan untuk studi genetik, pendiskriminasi kultivar, dan pemetaan genetik kedelai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih pada Prof. Suk-Ha Lee atas bantuannya dalam penelusuran akses kedelai koleksi USDA. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Nurwita Dewi yang telah membantu penyiapan materi genetik di lapang untuk isolasi DNA genomik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, J., D.H. Xu, Y. Suzuki, A. Kanazawa, and Y. Shimamoto. 2003. Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theor Appl Genet* 106: 445-453.
- Arisetyaningsih, R.E.D., A. D. H Totok, dan B. Prakoso. 2010. Keragaman genetik kedelai berdasarkan pola pita DNA hasil RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA). *Agrin*. 14 (1):37-43.
- Asadi. 2014. Pendayagunaan kedelai introduksi dalam perbaikan varietas. *Warta Biogen* 10(1): 8-10.
- Baranek, M., M. Kadlec, J. Raddova, M. Vachun and M. Pidra. 2002. Evaluation of genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr. accessions included in the Czech National Collection of Soybean Genotypes. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 38(2): 69-74.
- Bisen, A., D.Khare, P. Nair, and N. Tripathi. 2015. SSR analysis of 38 genotypes of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic diversity in India. *Physiol Mol Biol Plants*. 21(1):109-115.
- Botstein, D., R.L. Whie, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Bredemeijer, M., J. Cooke, W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, S. Roder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet* 105: 1019-1026.
- Chaerani, N., Hidayatun, dan D.W. Utami. 2011. Keragaman genetik 50 akses plasma nutfah kedelai berdasarkan sepuluh penanda mikrosatelit. *J. AgroBiogen* 7(2): 96-105.

- Chawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc. New Hampshire, USA.
- Corte, A.D., V. Moda-Cirino, C.A.A.Arias, J.F.F. de Toledo, and D. Destro. 2010. Genetic analysis of seed morphological traits and its correlations with grain yield in common bean. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 27-34.
- Direktorat Jenderal Tanaman Pangan. 2015. Petunjuk Teknis Pengelolaan Produksi Kedelai dan Bantuan Pemerintah Tahun Anggaran 2016. Kementerian Pertanian Direktorat Jenderal Tanaman Pangan.
- Diwan, N. and P.B. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Ghislain, M., D.M. Spooner, F. Rodriguez, F. Villamon, J. Nunez, C. Vasquez, R. Waugh, and M. Bonierbale. 2004. Selection of highly informative and user friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108: 881-890.
- Gore, J., C.A. Abel, J.J. Adamczyk, and G. Snodgrass. 2006. Influence of soybean planting date and soybean maturity group on stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) populations. *Environmental Entomology* 35(2): 531-536.
- Guan R., R. Chang, Y. Li, L. Wang, Z. Liu, and L. Qiu. 2010. Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. *Genet Resour Crop Evol* 57: 229-242.
- Hermanto; D. Sadikin, dan E. Hikmat. 2009. Deskripsi varietas unggul palawija 1918-2009. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. 330 hlm.
- Hildebrand, E., D.C. Torney, and R.P. Wagner. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science* 20: 100-102.
- Khamassi, K., I.J. Makay, M.B. Ali, S. Rezgui, D. O'Sullivan, and F.B. Jeddi. 2014. Agro-morphological variation and nutritional qualitative trait screening among field bean (*Vicia faba* L. var minor). *Legume Genomics and Genetics* 5(3): 7-24.
- Kumar, A., A. Pandey, C. Aochen, and A. Pattanayak. 2015. Evaluation of genetic diversity and interrelationship of agro morphological characters in soybean (*Glycine max*) genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 85(2): 397-405.
- Kumawat G, G. Singh, C. Ireesh, M. Shivakumar, M. Arya, D.K. Agarwal, and S.M. Husain. Molecular characterization and genetic diversity analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) germplasm accessions in India. *Physiol Mol Biol Plants.* 21: 101-107.
- Kuroda Y, N. Tomooka, A. Kaga, S.M.S.W Wanigadeva, D.A Vaughan. 2009. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) and Japanese cultivated soybeans [*G. max* (L.) Merr.] based on microsatellite (SSR) analysis and the selection of a core collection. *Genet Resour Crop Evol.* 56(8):1045–1055.
- Lazar, I. 2010. GelAnalyzer 2010 User's Manual 2010. http://www.gelanalyzer.com/downloads/users_manual_2010.pdf.
- Liu, K.. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics Research Center, North Carolina State University, Raleigh.
- Madesis, P., I. Ganopoulos, and A. Tsiftaris. 2013. Microsatellites: Evolution and Contribution. In: S.K. Kantartzi (Ed.). *Microsatellites Methods and Protocols*. Humana Press, Illinois, USA. p: 1-13.
- Mahbub, M.M., M.M. Rahman, M.S. Hossain, L. Nahar, and B.J. Shirazy. 2016. Morphophysiological variation in soybean (*Glycine max* (L.) Merril.). *American-Eurasian J.A gric. and Environ.* 16: 234-238.
- Moeljopawiro, S. 2010. Marka mikrosatelit sebagai alternatif uji BUSS dalam perlindungan varietas tanaman padi. *Buletin Plasma Nutfah* 16 (1): 1-7.
- Mulato, B.M., M. Moller, M.I. Zucchi, V. Quecini, and J.B. Pinheiro. 2010. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesq. Agropec.bras.* 45:276-283.
- Novelli, V.M., M. Cristofani-Yaly, M. Bastianel, D. A. Palmieri, and M. A. Machado. 2013. Screening of Genomic Libraries. In: S.K. Kantartzi (Ed.). *Microsatellites Methods and Protocols*. Humana Press, Illinois, USA. p: 17-24.
- Pandin, D. 2009. Keragaman genetik kultivar kelapa Dalam Mapanget (DMT) dan Dalam Tenga (DTA) berdasarkan penanda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Buletin Palma* 36: 17-29.
- Rahman, M.M., M.G. Rasul, M.K. Bashar, M.A. Syed, S.A. Saleh, and M.R. Islam. 2011. Parent selection for transplanted Aman rice breeding by morphological, physiological and molecular diversity analysis. *Libyan Agric. Res. Centre J. Int.* 2: 26-28. 7.
- Risliawati, A., E.I. Riyanti, P. Lestari, D.W. Utami, dan T.S. Silitonga. 2015. Development of SSR marker set to identify fourty two Indonesian soybean varieties. *J. AgroBiogen* 11(2): 49-58.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem. Version: 2.1. Exeter Software, New York.
- Salimi, S., H.S. Lahiji, G.M. Abadi, S. Salimi and S. Moradi. 2012. Genetic diversity in soybean genotypes under drought stress condition using factor analysis and cluster analysis. *World Applied Sciences Journal*, 16(4): 474-478

- Santoso, T.J., D.W. Utami, dan E. Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *J. AgroBiogen* 2(1): 1-7.
- Saptadi, D., R.R.S. Hartati, A. Setiawan, B. Heliyanto, dan Sudarsono. 2011. Pengembangan marka simple sequence repeat untuk *Jatropha* spp. *J. Litri* 17(4): 140-149.
- Sarwono, J. 2009. *Statistik itu Mudah: Panduan Lengkap untuk Belajar Komputasi Statistik Menggunakan SPSS 16*. Andi Publishers, Yogyakarta.
- Septiningsih, E.M., T.J. Santoso, D.W. Utami, dan N. Hidayatun. 2004. Analisis sidik jari DNA varietas tanaman pangan. *Kumpulan Makalah Seminar Hasil Penelitian BB Biogen Tahun 2014*: 140-151.
- Tasliah., H. Rijzaani, T.Z.P. Hariyadi, S. Yuriah, Rebin, Ma'sumah, dan T.S. Silitonga. 2013. Analisis keragaman genetik 161 aksesori mangga Indonesia menggunakan marka mikrosatelit. *Jurnal AgroBiogen* 9(3): 125-134.
- Tasma, I.M., A. Warsun, D. Satyawan, Syafaruddin, dan B. Martono. 2013. Analisis kekerabatan 50 aksesori kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) asal Kamerun berdasarkan marka mikrosatelit. *Jurnal AgroBiogen* 9(1): 19-27.
- Tyagi, S.D. and J. Sethi. 2011. Genetic diversity pattern in soybean [*Glycine max* L. Merrill]. *Res. J. Agric. Sci.* 2:288-290.
- Varshney, A., T. Mohapatra and R.P. Sharma. 2004. Molecular Mapping and Marker Assisted Selection of Traits for Crop Improvement. In: P.S. Srivastava, A. Narula and S. Srivastava (Eds.). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. Anamaya Publishers, New Delhi, India. p: 289-330.
- Wang, L., R. Guan, L. Zhangdong, R. Chang, and L. Qiu. 2005. Genetic diversity of classic cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci.* 46(3):1032-1038.
- Wen Z.X., Y.L. Ding, T.J. Zhao, J.Y. Gai. 2009. Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China. *Theor Appl Genet.* 119(2):371-381
- Widaningsih, N.A., E. Purwanto, Nandariyah, dan Reflinur. 2014. The use of DNA microsatellite markers for genetic diversity identification of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) as a supplementary method in reference collections management. *I.J. Biotech* 19(2): 136-145.
- Wiradjaja, F.S. 2012. Identifikasi penanda RAPD kedelai dengan primer OPF-16. Skripsi. Universitas Surabaya.
- Wirnas D., D. Sopandie, Trikoesoemaningtyas, dan Sobir. 2011. Analisis marka RAPD yang terpaut dengan toleransi terhadap naungan pada kedelai. *J. Agron. Indonesia.* 39: 73-78.
- Yono, D., Y. Wahyu, Sobir, dan N. Toruan-Mathius. 2017. Identifikasi penanda SSR yang berasosiasi dengan bobot tandan buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J. Agron. Indonesia* 45(1):79-85
- Zhang, G.W., S.C. Xu, W.H. Mao, Q.Z. Hu, and Y.M. Gong. 2013. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) using EST-SSR markers. *J.Zhejiang Univ Sci B.* 14:279-288.
- Zhou, X., J.T.E Carter, Z. Cui, S. Miyazaki, and J.W. Burton. 2002. Genetic diversity patterns in Japanese soybean cultivars based on coefficient of parentage. *Crop Sci.* 42(4):1331-1342.