

*Jurnal*  
**TANAMAN INDUSTRI  
DAN PENYEGAR**  
Journal of Industrial and Beverage Crops  
Volume 4, Nomor 3, November 2017

---

**KERAGAMAN GENETIK ANTAR KLON KOPI ROBUSTA LOKAL PAGAR ALAM  
BERDASARKAN ANALISIS MARKA SSR**

**GENETIC VARIABILITY AMONG INDIGENOUS ROBUSTA COFFEE CLONES FROM PAGAR ALAM  
BASED ON SSR MARKERS ANALYSIS**

\* Syafaruddin<sup>1)</sup>, Dani<sup>1)</sup>, dan Marcia Bunga Pabendon<sup>2)</sup>

**Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar<sup>1)</sup>**

Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

\* *den\_ovan@yahoo.com*

**Balai Penelitian Tanaman Serealia<sup>2)</sup>**

Jalan Dr. Ratulangi No. 274 Kotak Pos 173, Maros 90514 Indonesia

(Tanggal diterima: 12 Juli 2017, direvisi: 27 Agustus 2017, disetujui terbit: 30 November 2017)

**ABSTRAK**

Kopi Robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*) merupakan jenis kopi yang paling luas pengembangannya di Indonesia, termasuk wilayah Kota Pagar Alam, Sumatera Selatan. Pada beberapa dekade terakhir, banyak petani di Kota Pagar Alam melakukan seleksi dan rehabilitasi tanaman kopi Robusta secara klonal sehingga terbentuk beberapa populasi klon lokal. Pola tersebut dalam jangka panjang dikhawatirkan akan memusnahkan alel-alel penting dan mereduksi keragaman genetik kopi Robusta lokal di lahan petani. Tujuan penelitian adalah mengetahui keragaman genetik antar klon kopi Robusta lokal Pagar Alam berdasarkan analisis marka SSR. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Tanaman Serealia, Maros, mulai bulan Februari sampai April 2017. Karakterisasi molekuler 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam dilakukan menggunakan 33 marka SSR (*Simple Sequence Repeat*) polimorfik. Data biner yang dihasilkan selanjutnya dianalisis menggunakan program PowerMarker untuk mengetahui nilai polimorfisme (PIC), jumlah dan keragaman alel, serta nilai heterozigositas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 33 lokus SSR polimorfik menghasilkan 134 alel dengan rata-rata 4,06 alel/lokus, sedangkan nilai PIC antara 0,09–0,77 dengan rata-rata 0,48. Dari 33 lokus SSR, terdapat 19 lokus (57,58%) yang mempunyai nilai PIC sangat informatif (>0,55). Hasil konstruksi dendrogram menggunakan program NTSYS membagi 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam menjadi 4 kluster pada koefisien kemiripan genetik 0,53. Salah satu klon, yaitu KPA41 terpisah dalam kluster tersendiri sehingga berpotensi disilangkan dengan klon-klon lainnya. Berdasarkan nilai jarak genetik >0,55 dapat disusun 14 kombinasi persilangan antar klon yang berpotensi meningkatkan keragaman genetik kopi Robusta lokal Pagar Alam.

**Kata kunci:** *Coffea canephora* var. *robusta*, keragaman genetik, marka SSR, nilai jarak genetik

**ABSTRACT**

*Robusta coffee (Coffea canephora var. robusta) is the most extensive developed in Indonesia, including Pagar Alam, South Sumatra. In the last few decades, many farmers in Pagar Alam conducted clonal selection and rehabilitation of Robusta coffee trees that generated indigenous clonal populations. This pattern in the long period can damage important alleles and reduce the genetic diversity of indigenous Robusta coffee in farmland. The research aimed to know the genetic diversity among indigenous Robusta coffee clones developed in Pagar Alam based on SSR markers. The study was conducted at Molecular Biology Laboratory, Cereals Research Institute, Maros, from February to April 2017. Molecular characterization of 19*

indigenous Robusta coffee clones was conducted using 33 polymorphic SSR markers. The resulting binary data was then analyzed using PowerMarker program to determine polymorphism value (PIC), number and diversity of alleles, and heterozygosity values. The results showed that 33 polymorphic SSR loci produced 134 alleles with an average of 4.06 alleles/locus, whereas PIC values ranged from 0.09–0.77 with an average of 0.48. Of the 33 SSR loci, 19 loci (57.58%) exhibited very informative PIC value ( $> 0.55$ ). Dendrogram generated using NTSYS program divided 19 indigenous Robusta coffee clones into 4 clusters at 0.53 similarity coefficient. KPA41 clone was separated in its own cluster, potentially crossed with other clones. Based on genetic distance values  $> 0.55$ , could arrange 14 combinations of interclonal crosses that potentially increase the genetic variability of indigenous Robusta coffee from Pagar Alam.

**Keywords:** *Coffea canephora var robusta*, genetic diversity, genetic distance value, microsatellite markers

## PENDAHULUAN

Kopi Robusta merupakan jenis kopi yang paling banyak dikembangkan petani di Indonesia, namun produktivitasnya masih rendah, rata-rata kurang dari 1 ton per hektar (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2015). Produktivitas ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan Vietnam dan Brasil yang mampu menghasilkan biji kopi 1,5–2,0 ton per hektar (Indonesia-Investment, 2015). Bahkan klon-klon elit kopi Robusta di Brasil mampu mencapai 12 ton/ha pada kondisi manajemen intensif (DaMatta, Ronchi, Maestri, & Barros, 2007). Dengan demikian, peningkatan produktivitas kopi Robusta di tanah air merupakan tantangan bagi para agronom dan pemulia tanaman.

Kopi Robusta bersifat tidak kompatibel menyerbuki sendiri (*self-incompatible*) sehingga cenderung menyerbuk silang (*outcrossing*). Hal ini bertujuan mencegah efek tekanan silang dalam (*inbreeding depression*) (Nowak, Davis, Anthony, & Yoder, 2011). Oleh karena itu, agar dapat berproduksi optimal, harus ditanam dua hingga beberapa klon kopi Robusta yang saling kompatibel (Anim-Kwapong, Anim-Kwapong, & Oppong, 2010) atau dikenal dengan istilah poliklonal (Prastowo *et al.*, 2010). Pada beberapa jenis tanaman *self-incompatible*, kompatibilitas antar klon berkorelasi positif dengan jarak genetiknya (Alves, Silva, de Albuquerque, & Santos, 2017). Sementara itu, jarak genetik berkorelasi positif dengan heterosis nilai tengah tetua (*midparent heterosis*) (Usatov *et al.*, 2014). Dengan demikian, suatu populasi tanaman kopi Robusta yang di dalamnya terdapat keragaman genetik yang luas berpeluang menghasilkan buah dan biji lebih banyak sekaligus menghasilkan keturunan hibrida lebih unggul.

Kendala yang seringkali ditemukan di lapangan adalah kebiasaan petani di beberapa sentra produksi kopi Robusta, terutama Sumatera Selatan, Bengkulu, dan Lampung, yang hanya mengembangkan satu hingga beberapa klon paling disukai. Sebagian petani mengembangkan beberapa klon lokal hasil seleksi petani secara mandiri. Klon-klon terseleksi tersebut dikembangkan secara luas melalui teknik sambung tunas plagiotrop (*tak-ent*) dengan batang bawah berupa

tanaman kopi Robusta yang sudah berumur tua dan tidak produktif. Hasil analisis keragaman genetik yang telah dilakukan sebelumnya menggunakan penanda molekuler SSR terhadap beberapa klon lokal yang dikembangkan di wilayah Bengkulu menunjukkan keragaman genetik antar klon yang relatif sempit (Syafaruddin, Randriani, Dani, Sulistyorini, & Pabendon, 2014). Hal ini diduga karena klon-klon tersebut merupakan hasil seleksi petani dari populasi *sibling* yang sama.

Pola serupa juga diterapkan oleh petani di Sumatera Selatan, khususnya Kota Pagar Alam sebagai penghasil biji kopi Robusta terbaik di Indonesia. Petani kopi di daerah Kota Pagar Alam telah terbiasa melakukan seleksi pohon induk terbaik dan mengembangkannya melalui teknik sambung *tak-ent*. Kriteria seleksi yang digunakan adalah daya hasil tinggi dan atau ukuran buah/biji besar, serta tipe percabangan lentur (menjuntai). Populasi klonal kopi Robusta di daerah tersebut saat ini telah menyebar luas, menggantikan populasi yang berasal dari biji. Oleh karena itu, analisis keragaman genetik beberapa klon lokal di wilayah tersebut penting dilakukan.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa keragaman genetik *C. canephora* dapat dianalisis menggunakan beberapa tipe marka, antara lain marka isozyme (Montagnon, Guyot, Cilas, & Leroy, 1998), mikrosatelit atau SSR (Cubry *et al.*, 2008; Musoli *et al.*, 2009; Cubry, de Bellis, Pot, Musoli, & Leroy, 2013; Hendre & Aggarwal, 2014) dan RFLP (Gomez *et al.*, 2009). Di antara beberapa marka tersebut, marka SSR diketahui mempunyai keunggulan dibandingkan dengan marka yang lain, yaitu dapat digunakan untuk mengidentifikasi *C. arabica*, *C. canephora*, dan spesies terkait (Combes *et al.*, 2000). Selain itu, marka SSR juga telah digunakan untuk mengetahui polimorfisme antara aksesi *C. arabica* liar dan yang dibudidayakan (Rovelli *et al.*, 2000; Anthony *et al.*, 2002; Baruah *et al.*, 2003; Moncada & McCouch, 2004), serta untuk menganalisis introgresi DNA fragmen dari *C. canephora* dan *C. liberica* ke *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 2000; Gichuru *et al.*, 2008; Prakash, Combes, Somanna, & Lashermes, 2002). Dengan demikian, marka SSR

merupakan marka molekuler yang paling ideal untuk mempelajari keragaman genetik, struktur populasi, hubungan filogenetik, dan seleksi berbasis marka (Hendre & Aggarwal, 2014). Penelitian bertujuan mengetahui keragaman genetik antar 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam berdasarkan analisis marka SSR.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Tanaman Serealia (Balitserealia), Maros, Sulawesi Selatan, mulai bulan Februari hingga April 2017.

### Materi Tanaman

Materi tanaman yang digunakan untuk analisis keragaman genetik terdiri atas 19 nomor klon kopi Robusta lokal yang dikembangkan petani di wilayah Kota Pagar Alam ( $4^{\circ}1'0''S$   $103^{\circ}15'0''E$ ), Sumatera Selatan. Klon-klon lokal tersebut merupakan hasil seleksi individu yang kemudian dikembangkan petani secara klonal menggunakan teknik sambung tunas plagiotrop (*tak-ent*).

### Ekstraksi DNA

DNA diekstrak dari bagian daun kopi yang masih muda dan segar menggunakan prosedur CTAB dimodifikasi, seperti yang dijelaskan oleh George *et al.* (2004) dan Khan, Awan, Ahmad, & Khan (2004). Kualitas dan konsentrasi DNA ditentukan dengan migrasi melalui gel agarose 0,8% terhadap konsentrasi DNA standar ( $\lambda$  DNA) 10, 50, 100, dan 200 ng/ $\mu$ l. Migrasi DNA dalam gel agarose diekspose dengan menggunakan pewarna etidium bromida. Konsentrasi DNA yang digunakan untuk proses PCR adalah 10 ng/ $\mu$ l.

### Amplifikasi Marka SSR

Amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan 34 marka SSR yang telah digunakan sebelumnya oleh Missio *et al.* (2010) dan Syafaruddin *et al.* (2014) (Tabel 1). Proses amplifikasi dilakukan dengan total volume 10,0  $\mu$ l, terdiri atas 1,0  $\mu$ l DNA genomik dengan konsentrasi 10 ng/ $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l primer SSR *forward* dan *reverse* (konsentrasi 0,5  $\mu$ M), 6,25  $\mu$ l

PCR mix yang mengandung 0,2 mM masing-masing dNTP dan 1,5 mM  $MgCl_2$  (KAPA2G *Fast ReadyMix*), dan 2,25  $\mu$ l air ultrapure steril. Reaksi amplifikasi dilakukan pada suhu yang diatur untuk denaturasi, *annealing* dan *elongasi* pada mesin PCR TC-Plus menggunakan prosedur PCR *touchdown*. Siklus amplifikasi terdiri dari 2 menit awal denaturasi pada suhu 94°C, diikuti dengan 5 siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 45 detik, *annealing* selama 1 menit pada suhu 60°C, dengan penurunan suhu 1°C pada setiap siklus, perpanjangan selama 1 menit 30 detik pada suhu 72°C. Kemudian dilanjutkan dengan 30 siklus pada suhu 90°C selama 45 detik, pada suhu 54°C selama 1 menit dan pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik, diikuti perpanjangan selama 8 menit pada suhu 72°C. Pemisahan DNA hasil amplifikasi dilakukan pada gel poliakrilamid non-denaturasi dengan teknik elektroforesis menggunakan alat *dual triple-wide mini-verticals* (C.B.S. Scientific). Proses pewarnaan dan visualisasi pola pita DNA melalui perendaman dalam larutan etidium bromide mengikuti protokol dari C.B.S. Scientific. Hasil *genotyping* klon kopi Robusta lokal yang bersifat diploid diharapkan dapat memberikan maksimum dua alel per individu yang mungkin berbeda dalam posisi gel berdasarkan besarnya alel. Ukuran alel ditentukan dengan menggunakan kontrol *allelic* yang didefinisikan oleh (Cubry *et al.*, 2005).

### Analisis Data

Marka SSR yang menghasilkan pita polimorfik selanjutnya diskoring menggunakan format data biner, yaitu 1 jika ada pita, 0 jika tidak ada pita, dan 9 jika fragmen DNA tidak teramplifikasi. Data biner tersebut digunakan untuk melakukan analisis pengelompokan (*clustering*) berdasarkan matriks kesamaan genetik menggunakan program NTSYS-pc, 2.1 (Rohlf, 2000). Sementara nilai jarak genetik diperoleh dengan rumus  $1 - \text{nilai kesamaan genetik}$ . Selanjutnya data biner tersebut dimodifikasi menjadi tipe alel untuk tiap-tiap klon kopi Robusta lokal dan digunakan untuk melakukan analisis menggunakan program PowerMarker V3.25 (Liu & Muse, 2005). Informasi yang diperoleh dari program PowerMarker adalah tingkat polimorfisme (*Polymorphism Information Content*, PIC), jumlah dan keragaman alel, frekuensi alel, dan nilai heterozigositas.

Tabel 1. Lokus SSR yang digunakan untuk karakterisasi molekuler 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam, Sumatera Selatan  
Table 1. SSR locus used for molecular characterization of 19 indigenous Robusta coffee clones from Pagar Alam, South Sumatra

Primer	Sekuen	Kisaran alel (bp)
SSRCa003	F: ATG ATT CGT AGG TGG AGT GG R: CTA AGC CGC AAA TGA CAG A	160,80–239,20
SSRCa016	F: AGC AGA TTC CAT CCT TAT CCT R: CCA CTA ATC CAT TCC ATT CC	155,45–191,09
SSRCa019	F: GGG TTA GAT AGA GCA AGA ATG A R: CTG TGA AGG TGT GGA GTT TT	311,00–553,00
SSRCa023	F: GAC CCT TGC CTT TTG TTG R: GCC ATT CAT CCA TTC ATT C	236,75–311,00
SSRCa026	F: GAA TCT GGT GGG CTT TGA R: AAG GAG AGG GGA AGA AAA TG	89,20–104,50
SSRCa052	F: GAT GGA AAC CCA GAA AGT TG R: TAG AAG GGC TTT GAC TGG AC	118,00–229,40
SSRCa062	F: AAG TTA TTA GGG CAA GAG TGG A R: AAGCTCCAAGACCAAAGATG	239,20–303,25
SSRCa068	F: ATGTTGTTGG AGG CATTTC R: AGG AGC AGT TGT TGT TTT CC	212,25–249,00
SSRCa080	F: GTTCTTCCGCCGTCAAT R: GAG AAG AGA GAG GAA GGG AAA	163,25–255,20
SSRCa081	F: ACC GTT GTT GGA TAT CTT TG R: GGT TGA ACC TAG ACC TTA TTT	140,00–249,00
SSRCa082	F: GCTTGTTCCATCGCTAAA R: TTACACGTCAACCCACAAAC	191,83–264,50
SSRCa083	F: TCC AAC AAC ATT AAG CGT ATT C R: GAC AAA CCT GAG GGA AAA GA	131,20–183,66
SSRCa087	F: TCA CTC TCG CAG ACA CAC TAC R: GCA GAG ATG ATC ACA AGT CC	170,60–311,00
SSRCa088	F: TAC CTC TCC TCC TCC TTC CT R: ATT TCT ATG GAC CGG CAA C	100,00–151,00
SSRCa091	F: CGTCTCGTATCACGCTCTC R: TGT TCC TCG TTC CTC TCT CT	131,20–212,25
SSRCa092	F: ATA GCC TGA GCC GTA ACC A R: GGG TAA TTA TGA CGA GGG ACA	192,99–269,66
SSRCa094	F: GTG TCC TAG GGA AGG GTA AG R: GAG TGC TAG GAG AGG GAG AG	190,20–388,33
SSRCa095	F: GAG AGA GCC GAG TGA AGA GA R: GAG AGA GAA GCC ATG ATT TGA	180,40–349,66
CM2FAM	F: TGTGATGCCATTAGCCTAGC R: TCCAACATGTGCTGGTGATT	159,16–221,77
CM8FAM	F: GCCAATTGTGCAAAGTGCT R: ATTCATGGGGCCTTTGTCTT	89,20–107,71
CM16HEX	F: TGGGGAAAAGAAGGATATAGACAAGAG R: GAGGGGGGCTAAGGGAATAACATA	200,00–311,00
CarM101	F: TATGTCTCTAACTTTCTATTTT R: AGAGACTACATTTACACAGAAGA	105,14–140,00
CarM048	F: CCAGCAATCCTCCCTCCCACCAC R: TACCGTATGCAGAGACAACAATG	369,00–427,00
CarM049	F: ATGGCAAAGCAAATGTGGGAAGAG	272,25–383,50

Primer	Sekuen	Kisaran alel (bp)
	R: CACCTGAAGAAGATGACAAACTAAT	
CarM051	F: GATGTGGAGGAGGCTGCTGCTGAA R: TAGGGCGCCATCTGGTAGGGTTGT	109,00–500,00
CarM092	F: AGGCCAGACTTGTTTGATTTTGR R: GGCCCTTCTCGCTTTAGTTG	140,00–181,62
CarM096	F: TACTGGGGAAGAATTTATCATC R: TTAGGCCATCCAAGAGTATTC	290,33–427,00
CarM105	F: TGCTCCTACTAAATACCCAAACA R: ATATGCCCAAGAAAATTAGATGAAA	262,77–414,11
CFGA189NED	F: CAT CCA TCC GAA AAC TTC TAA CG R: CAGCACTGGCAAATAGCAACTCTT	239,20–280,00
CFGA502FAM	F: AAGCCACCCAGAAAACAGCACATC R: ATTTGCTTCTCATGTTCCCTTTCA	100,00–269,66
CFGA547aVIC	F: AAGGCATGCGGGCGGGAGTAT R: TCGTCAAGGACAATCCTAAAGC	269,66–553,00
M20	F: CTTGTTTGAGTCTGTGCTGCTG R: TTTCCCTCCCAATGTCTGTA	145,50–180,00
CarM052	F: AGCAGCTGCAGCCACAACA R: GAGTAAGAGCCCCAGAGCGTAACTT	275,57–427,00
M24	F: GGCTCGAGATATCTGTTTAG R: TTTAATGGGCATAGGGTCC	89,20–553,00

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Variasi Genetik Marka SSR

Sebanyak 34 lokus SSR digunakan untuk mengamplifikasi 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam, namun satu lokus (primer CarM096) tidak dapat teramplifikasi dengan sempurna pada semua klon yang digunakan. Sementara itu, 33 lokus lainnya menghasilkan pita polimorfik dan digunakan untuk analisis lebih lanjut. Profil 33 marka SSR polimorfik yang meliputi frekuensi alel, jumlah dan keragaman alel, heterozigositas, dan tingkat polimorfisme (PIC) disajikan pada Tabel 2. Dari tabel tersebut diketahui bahwa rata-rata frekuensi alel adalah 0,58 dengan frekuensi alel tertinggi ditunjukkan oleh primer SSRCa023 (0,95) dan terendah pada primer CarM101 (0,25). Jumlah alel per lokus bervariasi mulai dari 2–9 alel dengan rata-rata 4,06 alel/lokus. Informasi keragaman gen untuk setiap lokus antara 0,10–0,80 dengan rata-rata 0,53, sedangkan nilai heterozigositas antara 0,11–0,94 dengan rata-rata 0,54. Nilai polimorfisme (PIC) untuk 33 marka SSR polimorfik antara 0,09–0,77 dengan rata-rata 0,48, yang menunjukkan tingkat polimorfisme sedang. Botstein, White, Skolnick, & Davis (1980) mengemukakan bahwa nilai PIC (*Polymorphism Information Content*)

dijadikan sebagai standar dalam mengevaluasi marka genetik berdasarkan pita DNA hasil amplifikasi PCR, dengan mengelompokkan nilai PIC menjadi 3 kelas, yaitu PIC >0,5 tergolong sangat informatif, PIC 0,25–0,5 tergolong sedang, dan PIC < 0,25 tergolong rendah. Namun demikian, pada penelitian ini diperoleh 19 lokus SSR (57,58%) yang mempunyai nilai PIC tergolong sangat informatif (Tabel 3). Nilai PIC yang ditunjukkan oleh 19 lokus tersebut sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hendre & Aggarwal (2014).

Lokus yang sangat informatif, yaitu lokus yang memiliki nilai PIC tinggi (>0,5), merupakan sumber informasi penting dalam analisis keragaman genetik karena dapat menghasilkan variasi alel yang tinggi. Oleh karena itu, lokus tersebut dapat diaplikasikan untuk analisis keragaman genetik kopi Robusta yang diketahui mempunyai jumlah marka SSR yang relatif masih terbatas. Lokus-lokus yang sangat informatif juga dapat dipertimbangkan untuk digunakan dalam melakukan sidik jari (*finger printing*) kultivar kopi *C. canephora* secara manual jika marka SNP belum bisa digunakan. Namun demikian perlu pengujian lebih banyak genotipe, selain itu yang perlu diperhatikan adalah lokus-lokus tersebut harus menyebar pada semua kromosom di dalam genom.

Tabel 2. Variasi alel dari 33 marka SSR polimorfik yang digunakan untuk analisis keragaman genetik 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam, Sumatera Selatan

Table 2. Allelic variation of 33 polymorphic SSR markers used for genetic diversity analysis of 19 indigenous Robusta coffee clones from Pagar Alam, South Sumatra

Marker	Frekuensi alel	Jumlah alel	Keragaman alel	Heterosigositas (%)	PIC
SSRCa003	0,53	3,00	0,60	0,61	0,53
SSRCa016	0,92	2,00	0,15	0,16	0,13
SSRCa019	0,53	2,00	0,50	0,11	0,37
SSRCa023	0,95	2,00	0,10	0,11	0,09
SSRCa026	0,62	2,00	0,47	0,76	0,36
SSRCa052	0,45	5,00	0,70	0,68	0,65
SSRCa068	0,53	5,00	0,63	0,56	0,57
SSRCa080	0,79	2,00	0,33	0,32	0,28
SSRCa081	0,66	6,00	0,54	0,44	0,51
SSRca082	0,61	5,00	0,57	0,42	0,53
SSRCa083	0,47	5,00	0,68	0,72	0,63
SSRCa087	0,32	5,00	0,74	0,84	0,70
SSRCa088	0,45	5,00	0,63	0,84	0,56
SSRCa091	0,34	9,00	0,80	0,63	0,77
SSRCa092	0,39	4,00	0,67	0,74	0,61
SSRCa094	0,56	5,00	0,56	0,71	0,48
SSRCa095	0,28	5,00	0,79	0,89	0,76
CM2FAM	0,61	6,00	0,59	0,58	0,56
CM8FAM	0,58	5,00	0,61	0,53	0,57
CM16HEX	0,68	2,00	0,43	0,63	0,34
CarM101	0,25	7,00	0,79	0,94	0,76
CarM048	0,72	2,00	0,40	0,22	0,32
CarM049	0,84	2,00	0,27	0,21	0,23
CarM051	0,56	5,00	0,60	0,56	0,55
CarM052	0,37	8,00	0,77	0,84	0,74
CarM092	0,50	3,00	0,63	0,50	0,55
CarM105	0,79	2,00	0,33	0,32	0,28
CFGA189NED	0,92	4,00	0,16	0,11	0,15
CFGA502FAM	0,94	2,00	0,10	0,11	0,10
CFGA547aVIC	0,45	3,00	0,63	0,74	0,55
M20	0,61	4,00	0,55	0,61	0,50
M24	0,53	5,00	0,66	0,58	0,63
SSRCa062	0,56	2,00	0,49	0,88	0,37
Jumlah	19,28	134,00	17,48	17,88	15,74
Rata-rata	0,58	4,06	0,53	0,54	0,48

Keterangan: PIC = *Polymorphic Information Content* (tingkat polimorfisme)

Tabel 3. Locus SSR dengan tingkat polimorfisme tinggi pada 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam, Sumatera Selatan

Table 3. SSR locus with high polymorphism level on 19 Robusta coffee clones derived from Pagar Alam, South Sumatra

Lokus SSR	Jumlah alel per lokus SSR	Polimorfisme (%)
SSRCa091	9,00	0,77
CarM101	7,00	0,76
SSRCa095	5,00	0,76
CarM052	8,00	0,74
SSRCa087	5,00	0,70
SSRCa052	5,00	0,65
SSRCa083	5,00	0,63
M24	5,00	0,63
SSRCa092	4,00	0,61
SSRCa068	5,00	0,57
CM8FAM	5,00	0,57
CM2FAM	6,00	0,56
SSRCa088	5,00	0,56
CarM092	3,00	0,55
CFGA547aVIC	3,00	0,55
CarM051	5,00	0,55
SSRCa003	3,00	0,53
SSRca082	5,00	0,53
SSRCa081	6,00	0,51

### Pengelompokan 19 Klon Kopi Robusta Lokal Berdasarkan Marka SSR

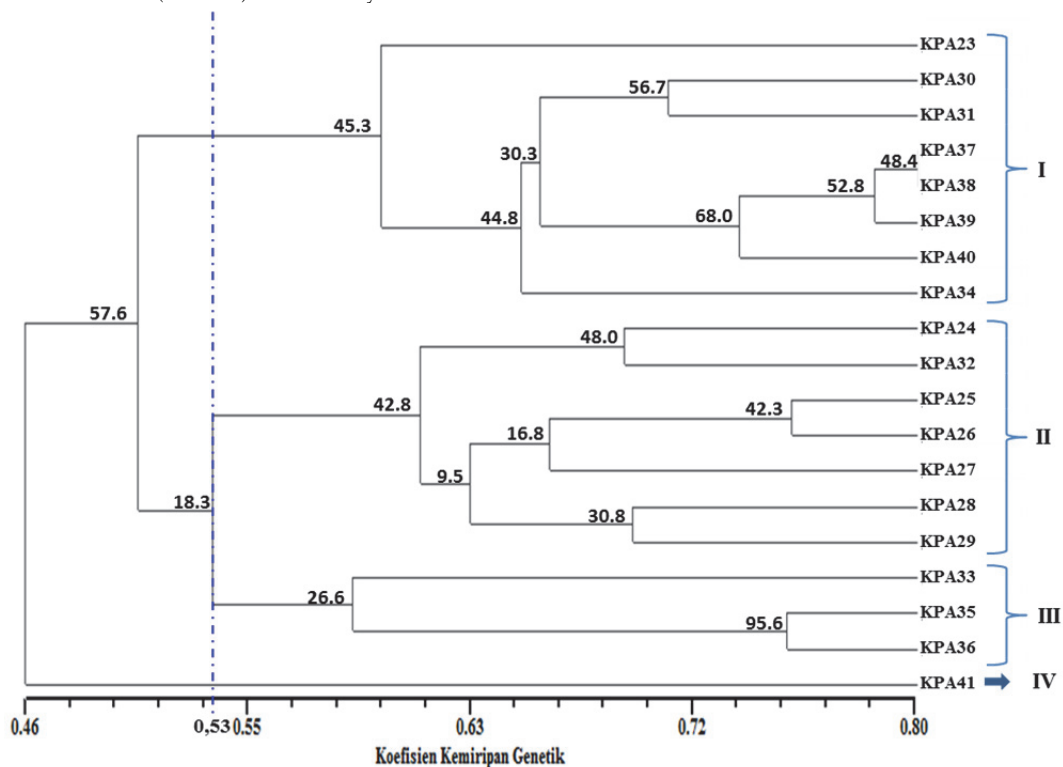
Sebanyak 19 klon kopi Robusta lokal yang digunakan pada penelitian ini berhasil dikelompokkan berdasarkan matriks kesamaan genetik yang terdapat pada program NTSYS (Gambar 1). Dendrogram berbasis UPGMA tersebut mempunyai koefisien kemiripan genetik antara 0,46–0,80, yang menunjukkan bahwa 19 klon yang dianalisis memiliki kemiripan genetik sedang sampai tinggi. Berdasarkan hasil perhitungan koefisien korelasi kofenetik ( $r$ ), yaitu sebesar 0,87 (*good fit*) (Rohlf, 2000), mengindikasikan bahwa 33 marka SSR yang digunakan dapat menghasilkan dendrogram yang cukup akurat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pejic *et al.* (1998) yang mengemukakan bahwa nilai koefisien korelasi kofenetik ( $r$ ) menggambarkan akurasi pengelompokan secara genotipik.

Pada tingkat kemiripan genetik 0,53, 19 klon kopi Robusta lokal terbagi menjadi 4 klaster utama, yaitu klaster I (klon KPA23, KPA30, KPA31, KPA34, KPA37, KPA38, KPA39, dan KPA40), klaster II (KPA24, KPA25, KPA26, KPA27, KPA28, KPA29, dan KPA32), klaster III (klon KPA33, KPA35, dan KPA36), dan klaster IV (KPA41). Munculnya klaster

dengan anggota tunggal juga ditunjukkan pada hasil analisis keragaman genetik antar klon kopi Robusta lokal Bengkulu yang juga dikembangkan oleh petani menggunakan teknik sambung tunas plagiotrop (Syafaruddin *et al.*, 2014).

Klon KPA41 diduga memiliki jalur silsilah (*pedigree*) yang berbeda. Salah satu kemungkinannya adalah merupakan keturunan hasil persilangan alami (*spontaneous hybrid*) antara spesies *C. canephora* dengan *C. liberica*. Spesies kopi lainnya, baik Arabika maupun Liberika, seringkali ditanam petani secara campur dengan jenis Robusta sehingga memberikan peluang terjadinya persilangan alami antar spesies (Mishra & Slater, 2012).

Tingkat kepercayaan pengelompokan untuk klaster I, II, dan III berturut-turut adalah 45,3%, 42,8%, dan 26,6%, yang tergolong relatif rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh jumlah marka yang digunakan untuk analisis masih terbatas serta marka SSR yang digunakan mempunyai nilai rata-rata polimorfisme (PIC) sedang ( $<0,5$ ). Meskipun demikian, marka SSR yang digunakan berhasil membedakan setiap individu klon kopi Robusta lokal yang berasal dari Kota Pagar Alam, Sumatera Selatan.



Gambar 1. Dendrogram 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam, Sumatera Selatan berdasarkan 33 marka SSR. Angka di atas garis menunjukkan tingkat kepercayaan pengelompokan berdasarkan metode Bootstrap.

Figure 1. Dendrogram of 19 indigenous Robusta coffee clones derived from Pagar Alam, South Sumatra based on 33 SSR markers. The number above the line shows the confidence level of the grouping based on the Bootstrap method.

Selain mengelompokkan klon kopi Robusta lokal berdasarkan nilai kesamaan genetiknya, informasi lain yang diperoleh pada penelitian ini adalah estimasi nilai jarak genetik antar klon. Mengetahui nilai jarak genetik antar klon sangat penting bagi pemulia dalam rangka menentukan kombinasi tetua persilangan terbaik. Hasil estimasi nilai jarak genetik antar klon kopi Robusta lokal antara 0,195–0,602 dengan rata-rata umum sebesar 0,434 (Tabel 4). Estimasi nilai jarak genetik terendah ditemukan pada pasangan KPA38 vs KPA37, sedangkan estimasi nilai jarak genetik tertinggi diperoleh pada pasangan KPA41 vs KPA23. Nilai jarak genetik 0,434 tergolong sedang, yang sudah tergambar sebelumnya dari koefisien kemiripan genetik antara 0,46–0,80 (Gambar 1). Persilangan antar klon kopi Robusta dari kelompok berbeda akan menghasilkan efek heterosis yang lebih besar (Dalcomo *et al.*, 2015). Dengan asumsi estimasi jarak genetik >0,55 dapat meningkatkan keragaman genetik (Yu, Wang, Sun, & Liu, 2012), maka dari total 171 peluang kombinasi, terdapat 14 pasang kombinasi yang berpotensi meningkatkan keragaman genetik kopi *C. canephora* (Tabel 5). Dari total 14 pasang kombinasi tersebut, 7 pasang di antaranya melibatkan genotipe KPA41.

Sebagaimana terlihat pada dendrogram, genotipe KPA41 mengelompok sendiri pada kluster IV, sehingga mempunyai peluang lebih besar untuk memiliki pasangan dengan nilai jarak genetik lebih tinggi dari ketiga kluster lainnya. Sebanyak 18 peluang kombinasi dengan genotipe KPA41 memiliki jarak genetik yang lebih besar dari rata-rata jarak genetik. Hal ini menunjukkan bahwa genotipe KPA41 dapat dijadikan sebagai salah satu materi genetik persilangan untuk meningkatkan keragaman genetik kopi *C. canephora*.

Tabel 5 menunjukkan 14 kombinasi tetua dengan nilai jarak genetik >0,55 yang berpotensi meningkatkan keragaman genetik klon kopi Robusta lokal Pagar Alam. Setiap kombinasi tetua persilangan tersebut berasal dari kluster yang berbeda.

Salah satu keuntungan dari analisis kluster (*cluster analysis*) adalah mempermudah dalam mengelompokkan dan mengidentifikasi genotipe-genotipe yang berkerabat dekat atau jauh untuk tujuan pemuliaan. Sebagai contoh, klon KPA41, yang berdiri sendiri pada kluster IV, berpotensi untuk dipilih sebagai materi genetik penting dalam meningkatkan keragaman genetik kopi Robusta Pagar Alam.

Tabel 4. Matriks jarak genetik 19 klon kopi Robusta lokal yang berasal dari Kota Pagar Alam, Sumatera Selatan berdasarkan 33 marka SSR  
Table 4. Genetic distance matrix of 19 indigenous Robusta coffee clones derived from Pagar Alam, South Sumatra based on 33 SSR markers

Genotipe	KPA23	KPA24	KPA25	KPA26	KPA27	KPA28	KPA29	KPA30	KPA31	KPA32	KPA33	KPA34	KPA35	KPA36	KPA37	KPA38	KPA39	KPA40	KPA41
KPA23	0,000																		
KPA24	0,480	0,000																	
KPA25	0,500	0,350	0,000																
KPA26	0,481	0,321	0,244	0,000															
KPA27	0,519	0,377	0,422	0,250	0,000														
KPA28	0,516	0,357	0,343	0,268	0,333	0,000													
KPA29	0,440	0,345	0,420	0,381	0,453	0,304	0,000												
KPA30	0,389	0,467	0,522	0,524	0,576	0,530	0,410	0,000											
KPA31	0,430	0,443	0,547	0,538	<b>0,557</b>	0,540	0,457	0,291	0,000										
KPA32	0,494	0,308	0,422	0,414	0,492	0,386	0,393	0,462	0,408	0,000									
KPA33	0,544	0,511	0,489	0,449	0,458	0,425	0,491	<b>0,551</b>	0,443	0,426	0,000								
KPA34	0,436	0,486	<b>0,561</b>	0,543	0,544	<b>0,554</b>	0,482	0,374	0,341	0,494	0,367	0,000							
KPA35	0,512	0,404	0,520	0,476	0,424	0,438	0,424	0,535	0,513	0,459	0,400	0,421	0,000						
KPA36	0,523	0,450	0,490	0,492	0,468	0,458	0,464	0,512	0,524	0,545	0,423	0,416	0,246	0,000					
KPA37	0,372	0,500	0,508	0,506	0,542	0,538	0,429	0,289	0,367	0,537	0,492	0,299	0,463	0,420	0,000				
KPA38	0,402	0,458	0,545	0,506	0,506	0,492	0,425	0,318	0,360	<b>0,557</b>	0,476	0,329	0,462	0,456	0,195	0,000			
KPA39	0,362	0,531	<b>0,565</b>	0,529	<b>0,565</b>	0,492	0,453	0,278	0,356	0,506	0,462	0,363	0,488	0,482	0,198	0,226	0,000		
KPA40	0,411	0,457	0,548	0,480	0,446	0,416	0,382	0,369	0,514	0,375	0,376	0,432	0,468	0,306	0,253	0,232	0,000		
KPA41	<b>0,602</b>	<b>0,571</b>	<b>0,604</b>	0,484	0,483	<b>0,571</b>	0,543	<b>0,586</b>	0,538	<b>0,563</b>	0,481	0,538	0,484	0,544	<b>0,553</b>	0,543	0,524	0,446	0,000
<b>Rerata</b>	<b>0,467</b>	<b>0,432</b>	<b>0,484</b>	<b>0,456</b>	<b>0,494</b>	<b>0,475</b>	<b>0,449</b>	<b>0,416</b>	<b>0,422</b>	<b>0,511</b>	<b>0,434</b>	<b>0,392</b>	<b>0,429</b>	<b>0,474</b>	<b>0,313</b>	<b>0,341</b>	<b>0,378</b>	<b>0,446</b>	<b>0,000</b>
Jumlah pasangan persilangan	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Jumlah peluang rekombinasi	1	1	3	0	3	2	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Keterangan: Angka yang ditulis biru menunjukkan nilai jarak genetik >0,55  
Notes : Numbers written in blue show enetic distance >0,55



Tabel 5. Kombinasi tetua yang berpeluang untuk meningkatkan keragaman genetik kopi Robusta lokal Pagar Alam, Sumatera Selatan  
Table 5. Promising parental combinations to increase the genetic variability of indigenous Robusta coffee from Pagar Alam, South Sumatra

Rekombinasi	Klaster	Estimasi Jarak Genetik
KPA23 x KPA41	I vs IV	0,602
KPA24 x KPA41	II vs IV	0,571
KPA25 x KPA34	II vs I	0,561
KPA25 x KPA39	II vs I	0,565
KPA25 x KPA41	II vs IV	0,604
KPA27 x KPA30	II vs I	0,576
KPA27 x KPA31	II vs I	0,557
KPA27 x KPA39	II vs I	0,565
KPA28 x KPA34	II vs I	0,554
KPA28 x KPA41	II vs IV	0,571
KPA30 x KPA41	I vs IV	0,586
KPA32 x KPA37	II vs I	0,557
KPA32 x KPA41	II vs IV	0,563
KPA37 x KPA41	I vs IV	0,553

## KESIMPULAN

Marka SSR yang digunakan berhasil mengelompokkan 19 klon kopi Robusta lokal Pagar Alam terbagi ke dalam 4 klaster utama pada tingkat kemiripan genetik 0,53. Keragaman genetik 19 klon kopi *C.canephora* terindikasi sedang sehingga perlu ditingkatkan melalui persilangan klon yang memiliki jarak genetik jauh. Salah satu klon, yaitu KPA41 terpisah dalam klaster tersendiri sehingga berpotensi tinggi untuk menghasilkan keragaman genetik baru yang lebih luas apabila disilangkan dengan klon-klon lainnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada peneliti tim Balittri (Ir. Handi Supriadi, Ir. Enny Randriani, Januar Firmansyah) yang mengumpulkan aksesori kopi Robusta lokal Pagar Alam (Sumatera Selatan) dan tim di Laboratorium Biologi Molekuler Balitsereal (Haryati, Fristy Damanik, dan Editha Dwijayanti).

## DAFTAR PUSTAKA

Alves, R. M., Silva, C.R. S, de Albuquerque, P. S. B., & Santos, D. (2017). Phenotypic and genotypic characterization and compatibility among genotypes to select elite clones of cupuassu. *Acta Amazonica*, 47(3), 175–184. doi:10.1590/1809-4392201602104

Anim-Kwapong, G. J., Anim-Kwapong, E., & Oppong, F. K. (2010). Evaluation of some Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex a. Froehner) clones for optimal density planting in Ghana. *African Journal of Agricultural Research*, 5(1), 84–89. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80054008736&partnerID=40&md5=8fe5600236818ab8109bb81d99c20c50>

Anthony, F., Astorga-Domian, C. G., Quiros, O., Bertrand, B., Etienne, H., Topart, P., & Lashermes, P. (2002). Genetic diversity of wild and cultivated coffees (*Coffea arabica*), revealed by molecular markers. *Boletin Promecafe*, 96, 7–12.

Baruah, A., Naik, V., Hendre, P. S., Rajkumar, R., Rajendrakumar, P., & Aggarwal, R. K. (2003). Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* L., showing wide cross-species amplifications. *Molecular Ecology Notes*, 3(4), 647–650. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00544.x

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), 314–331. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

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

- Cubry, P., de Bellis, F., Pot, D., Musoli, P., Legnate', H., Leroy, T., & Dufour, M. (2005). Genetic diversity analyses and linkage disequilibrium evaluation in some natural and cultivated populations of *Coffea canephora*. In *Proceedings of the 4th Plant Genomics European Meeting, Amsterdam, 20–23 September 2005*.
- Cubry, P., de Bellis, F., Pot, D., Musoli, P., & Leroy, T. (2013). Global analysis of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Rubiaceae) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(2), 483–501. doi:10.1007/s10722-012-9851-5
- Cubry, P., Musoli, P., Legnaté, H., Pot, D., de Bellis, F., Poncet, V., ... Leroy, T. (2008). Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. *Genome*, 51(1), 50–63. doi:10.1139/G07-096
- Dalcom, J. M., Vieira, H. D., Ferreira, A., Lima, W. L., Ferrão, R. G., Fonseca, A. F. A., ... Partelli, F. L. (2015). Evaluation of genetic divergence among clones of conilon coffee after scheduled cycle pruning. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 15417–15426. doi:10.4238/2015.November.30.19
- DaMatta, F. M., Ronchi, C. P., Maestri, M., & Barros, R. S. (2007). Ecophysiology of coffee growth and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(4), 485–510. doi:10.1590/S1677-04202007000400014
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2015). *Statistik perkebunan Indonesia 2014-2016: Kopi*. (E. Subiyantoro & Y. Arianto, Eds.). Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan.
- George, M. L., Regalado, E., Li, W., Cao, M., Dahlan, M., Pabendon, M., ... Hoisington, D. (2004). Molecular characterization of Asian maize inbred lines by multiple laboratories. *Theor Appl Genet.*, 109(1), 80–91.
- Gichuru, E. K., Agwanda, C. O., Combes, M. C., Mutitu, E. W., Ngugi, E. C. K., Bertrand, B., & Lashermes, P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology*, 57(6), 1117–1124.
- Gomez, C., Dussert, S., Hamon, P., Hamon, S., Kochko, A. de, & Poncet, V. (2009). Current genetic differentiation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehn in the Guineo-Congolian African zone: Cumulative impact of ancient climatic changes and recent human activities. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 167. doi:10.1186/1471-2148-9-167
- Hendre, P. S., & Aggarwal, R. K. (2014). Development of genic and genomic SSR markers of Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *PLoS ONE*, 9(12), 1–34. doi:10.1371/journal.pone.0113661
- Indonesia-Investment. (2015). Coffee. Retrieved from <https://www.indonesia-investments.com/business/commodities/coffee/item186?>
- Khan, I. A., Awan, F. S., Ahmad, A., & Khan, A. A. (2004). A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 89–89. doi:10.1007/bf02773355
- Lashermes, P., Andrzejewski, S., Bertrand, B., Combes, M. C., Dussert, S., Graziosi, G., ... Anthony, F. (2000). Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 139–146. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s001220050019>
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005). PowerMaker: An integrated analysis environment for genetic maker analysis. *Bioinformatics*, 21(9), 2128–2129. doi:10.1093/bioinformatics/bti282
- Mishra, M. K., & Slater, A. (2012). Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology Research International*, 2012, 1–17. doi:10.1155/2012/580857
- Missio, R., Caixeta, E., Zambolin, E., Zambolin, L., Cruz, C., & Sakiyama, N. (2010). Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10, 89–94.
- Moncada, P., & McCouch, S. (2004). Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome*, 47(3), 501–509. doi:10.1139/g03-129
- Montagnon, C., Guyot, B., Cilas, C., & Leroy, T. (1998). Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffee, *Coffea canephora*. *Plant Breeding*, 117, 576–578.
- Musoli, P., Cubry, P., Aluka, P., Billot, C., Dufour, M., De Bellis, F., ... Leroy, T. (2009). Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome*, 52(7), 634–646. doi:10.1139/G09-037
- Nowak, M. D., Davis, A. P., Anthony, F., & Yoder, A. D. (2011). Expression and trans-specific polymorphism of self-incompatibility rnses in *Coffea* (Rubiaceae). *PLoS ONE*, 6(6). doi:10.1371/journal.pone.0021019

- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., & Motto, M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(8), 1248–1255. doi:10.1007/s001220051017
- Prakash, N. S., Combes, M. C., Somanna, N., & Lashermes, P. (2002). AFLP analysis of introgression in coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) derived from a natural interspecific hybrid. *Euphytica*, 124(3), 265–271. doi:10.1023/A:1015736220358
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubiyo, Siswanto, Indrawanto, C., & Munarso, S. J. (2010). *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Retrieved from [http://perkebunan.litbang.pertanian.go.id/wp-content/uploads/2012/08/perkebunan\\_budidaya\\_kopi.pdf](http://perkebunan.litbang.pertanian.go.id/wp-content/uploads/2012/08/perkebunan_budidaya_kopi.pdf)
- Rohlf, F. J. (2000). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1*. Applied Biostatistics Inc.
- Rovelli, P., Mettullo, R., Anthony, F., Anzueto, F., Lashermes, P., & Graziosi, G. (2000). Microsatellites in *Coffea arabica* L. In T. Sera, C. R. Soccol, A. Pandey, & S. Roussos (Eds.), *Coffee biotechnology and quality: Proceedings of the 3rd international seminar on biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil* (pp. 123–133). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-1068-8\_9
- Syafaruddin, Randriani, E., Dani, Sulistyorini, I., & Pabendon, M. B. (2014). Genetic variability of 15 Robusta coffee genotypes selected by farmer based on SSRs markers. *J. TIDP*, 1(2), 87–94.
- Usatov, A. V., Klimenko, A. I., Azarin, K. V., Gorbachenko, O. F., Markin, N. V., Tikhobaeva, V. E., ... Getmantseva, L. (2014). The relationship between heterosis and genetic distances based on SSR markers in *Helianthus annuus*. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 9(3), 270–276. doi:10.3844/ajabssp.2014.270.276
- Yu, R. H., Wang, Y. L., Sun, Y., & Liu, B. (2012). Analysis of genetic distance by SSR in waxy maize. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 254–260.

