

Analisis Sidik Jari DNA Plasma Nutfah Kedelai Menggunakan Markah SSR

Tri Joko Santoso, Dwinita W. Utami, dan Endang M. Septiningsih

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

DNA Fingerprinting Analysis of Soybean Germplasm using SSR Markers. *Tri Joko Santoso, Dwinita W. Utami, and Endang M. Septiningsih.* Accuracy is an important issue for plant germplasm identification, especially for varietal conformation, registration, and plant protection. A study was conducted to determine genetic variation in 96 soybean accessions based on variation in size and number alleles using fluorescently-labeled SSR (Simple Sequence Repeat) markers on a capillary-electrophoresis DNA analyzer. This technology can be used to measure sizes of DNA fragments accurately and the genotyping protocol can be automated in a high-throughput manner. In addition, the germplasm as a whole can be further analyzed to measure the amount of genetic diversity and to identify agronomically-important genes or alleles for variety improvement. Results of the study indicated that nearly all the soybean accessions tested showed unique DNA fingerprints or genetic identities. The rare alleles (frequency <5%) that might have the potential in the variety improvement program had also been detected. Identification of the 96 soybean accessions using 10 SSR markers had detected 116 alleles, ranging between 7-19 alleles per locus, with the value of PIC (Polymorphism Information Content), reflecting the value of frequency and allele variation) 0.703. The tendency for clustering together of the alleles in certain groups of the improved soybean varieties indicating that there were close genetic relationships among them. In addition, molecular differences between two accessions having the same names but with different number of registrations were detected. Furthermore, the presence of two soybean accessions with different names but having the same molecular identity was also identified.

Key words: DNA fingerprinting, soybean genetic diversity, fluorescently-labeled SSR markers.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, kedelai merupakan tanaman pangan yang penting kedua setelah padi. Produksi kedelai saat ini masih belum mencukupi kebutuhan nasional dan impor kedelai terus meningkat (Abdurachman *et al.* 1999). Pemuliaan tanaman kedelai terus dilakukan untuk memperbaiki sifat-sifat penting, termasuk produktivitasnya. Salah satu kegiatan yang dilakukan dalam program pemuliaan kedelai adalah

seleksi. Keberhasilan seleksinya ditentukan oleh keberadaan keragaman genetik yang luas pada populasi dasar atau plasma nutfah kedelai yang digunakan dalam pemuliaan.

Karakterisasi plasma nutfah tanaman secara lebih luas menggunakan markah molekuler dapat memberikan hasil yang lebih cepat, efektif, dan akurat dibandingkan dengan karakterisasi berdasarkan ciri-ciri morfologi. Karakterisasi menggunakan markah molekuler dapat dilakukan pada stadium awal, bahkan dapat dilakukan pada benih dan tidak bersifat merusak karena hanya membutuhkan sedikit sampel serta tidak bias oleh faktor lingkungan. Karakterisasi secara molekuler juga dapat digunakan bersama dan saling melengkapi dengan karakterisasi berdasarkan ciri-ciri morfologi.

Pada saat ini, markah molekuler yang telah digunakan secara luas adalah SSR (*Simple Sequence Repeat*) atau mikrosatelit. Markah ini telah digunakan pada berbagai studi, di antaranya studi keragaman genetik atau identifikasi varietas tanaman (Blair *et al.* 1999; Bredemeijer *et al.* 2002). SSR merupakan *tandem arrays* dari 2-5 pasangan basa nukleotida berulang yang ditemukan secara luas pada organisme Eukariota. Markah ini bersifat kodominan dan dapat mendeteksi variasi alel yang tinggi (Wu dan Tanksley 1993; Panaud *et al.* 1996). Oleh karenanya, markah ini dapat digunakan untuk mendeteksi aksesori tanaman yang berkerabat dekat secara lebih baik dibandingkan dengan markah molekuler yang lain. SSR dapat dideteksi dengan pewarnaan menggunakan teknik *Silver Staining PAGE* (pewarnaan perak dengan teknik *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Proses deteksi SSR juga dapat diotomatisasi dengan menggunakan *fluorescently-labeled markers* dan alat analisis genetik (*genetic analyzer*). Kelebihan utama dari teknik ini adalah pembacaan fragmen DNA lebih akurat (ketelitian sampai 1 bp), lebih otomatis, dan *highthroughput* (markah yang berbeda ukuran fragmen DNA dan warna labelnya dapat diproses bersamaan dalam sekali pendeteksian (*running*)).

Identifikasi tanaman kedelai secara molekuler dapat menjadi pelengkap atau alternatif untuk mengidentifikasi varietas secara morfologi. Usaha membuat pangkalan data (database) yang sistematis untuk

mengidentifikasi varietas berdasarkan sidik jari DNA telah dimulai, misalnya pada tanaman tomat (Bredemeijer *et al.* 2002). Identifikasi varietas dilakukan dalam rangka registrasi dan perlindungan tanaman. Registrasi tanaman memerlukan bukti bahwa varietas tersebut benar-benar baru (*novelty*). Selain itu, diperlukan pula konformasi varietas turunan yang penting (*essentially derived varieties*) (van Eeuwijk dan Baril 2001). Adanya jaminan perlindungan tanaman dari pemerintah diharapkan dapat menggairahkan bisnis pemuliaan kedelai di Indonesia karena dapat memacu, terutama pihak swasta, untuk ikut berperan aktif. Di samping itu, perlindungan varietas yang baik diharapkan dapat mencegah "pencurian" plasma nutfah oleh pihak asing.

Hasil identifikasi varietas-varietas yang sudah diperbaiki dalam tahap selanjutnya juga dapat digunakan untuk mengetahui keragaman genetik di antara varietas unggul dalam koleksi plasma nutfah dengan membandingkannya dengan varietas lokal dan aksesori liarnya. Sebagai contoh, keragaman genetik tanaman padi yang dibudidayakan saat ini cukup sempit sebagai akibat dari praktek pemuliaan tanaman modern (Yang *et al.* 1994). Hal ini menyebabkan sebagian besar tanaman budi daya rentan terhadap cekaman biotik dan abiotik, sehingga produktivitasnya berkurang. Salah satu terobosan utama yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan memanfaatkan sebaik mungkin keragaman plasma nutfah yang dimiliki, kemudian potensi yang ada diikutsertakan dalam program perbaikan tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi plasma nutfah kedelai dengan menggunakan markah SSR dan mengetahui keragaman genetiknya berdasarkan perbedaan ukuran dan jumlah alelnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi Terpadu dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen). Penanaman benih plasma nutfah kedelai untuk bahan isolasi DNA dilakukan di rumah kaca BB-Biogen. Penelitian dilakukan dari Januari sampai Desember 2004.

Pemilihan Aksesori Plasma Nutfah dan Markah SSR

Pada penelitian ini digunakan 96 aksesori tanaman kedelai (Tabel 1) yang sebagian besar merupakan varietas unggul yang terdapat dalam koleksi BB-Biogen, aksesori lokal, dan beberapa varietas introduksi. Sepuluh markah SSR yang spesifik untuk kedelai digunakan da-

lam penelitian ini. Sekuen dari masing-masing primer SSR disajikan pada Tabel 2.

Penanaman Benih Bahan Penelitian

Benih kedelai (dari aksesori yang akan diuji) ditanam di rumah kaca sebagai bahan untuk isolasi DNA. Kedelai ditanam tiga benih per aksesori dalam plastik polibag. Selanjutnya tanaman djarangkan sehingga hanya tertinggal satu tanaman per aksesori. Pemeliharaan dilakukan sesuai dengan rekomendasi untuk budi daya tanaman kedelai.

Koleksi, Isolasi, dan Pengecekan Kuantitas Sampel, dan Kualitas DNA Sampel

Daun muda tanaman kedelai (umur 3-5 minggu) berukuran sekitar 2 cm², diambil dari tanaman yang ditumbuhkan di rumah kaca dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf ukuran 2 ml. Tabung eppendorf yang berisi sampel tersebut kemudian dimasukkan dalam kotak pendingin yang berisi nitrogen cair. Isolasi DNA dilakukan dengan protokol yang sudah baku dalam skala miniprep menggunakan prosedur menurut Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi.

Kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh dicek terlebih dahulu dengan melakukan *running* dalam gel agarose 1% bersama-sama dengan beberapa *Lambda* DNA *standard* yang sudah diketahui ukurannya dengan menggunakan alat elektroforesis. Kuantitas DNA lebih lanjut dihitung dengan menggunakan alat *chemidoc*. Proses ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen.

Uji PCR Sampel DNA

Uji PCR sampel DNA tanaman kedelai dilakukan menggunakan protokol *FastStart* (*Taq* DNA *Polymerase*) yang dimodifikasi sesuai dengan keperluan. Markah SSR yang digunakan adalah markah SSR yang berlabel fluorescen, dengan warna hitam, hijau atau biru. Uji PCR dilakukan baik di Laboratorium Biologi Molekuler maupun di Laboratorium Litbang Biotek Terpadu, BB-Biogen. Tahapan proses PCR tersebut adalah sebagai berikut:

1. Denaturasi pada suhu 95°C selama 4 menit, 1 siklus.
2. Denaturasi pada suhu 95°C selama 45 detik.
3. *Annealing* (penempelan primer) pada suhu 60-55°C selama 45 detik.
4. *Elongation* (perpanjangan basa) pada suhu 72°C selama 30 detik.
5. Tahap 2-4 diulang 13 kali, dengan program *touch-down* (penurunan suhu secara teratur) dengan per-

Tabel 1. Sembilan puluh enam aksesi plasma nutfah kedelai yang digunakan dalam penelitian.

ID	No. aksesi	Nama aksesi	Group	ID	No. aksesi	Nama aksesi	Grup
1.	B-3835(I)	IAC-100	Introduksi	49.	B-3490 Hitam	Hitam	Lokal
2.	B-3443	MLG 3200/Malang	Lokal	50.	B-1459 A Samarinda	Samarinda	Lokal
3.	B-3611	Lokal Kediri	Lokal	51.	B-3184	Hitam Lokal	Lokal
4.	B-1354	317x882/ii/4/i/o/o	Introduksi	52.	B-3660	Lok. Lumajang	Lokal
5.	B-4314	No. 712	Introduksi	53.	B-3749	Var. 8404-1-10	Belum diketahui
6.	B-3835 (II)	IAC-100	Introduksi	54.	B-1635	Kedepe Presi	Lokal
7.	B-1335	871x4179/151/1/o/o/o	Lokal	55.	B-3702	Lokal Kr. Asem	Lokal
8.	3665	Lokal Pasuruan	Lokal	56.	B-3610 Lok. Kediri	Lokal Kediri	Lokal
9.	B-1649	AVRDC-2040	Introduksi	57.	B-3489 Hitam	Hitam	Lokal
10.	B-1643	CES-407	Introduksi	58.	B-3570	1682/1248	Belum diketahui
11.	B-4218 17/18/7/7/0	17/18/7/7/0	Introduksi	59.	B-1670	Lokal Sumbar	Lokal
12.	B-3951 30134-56	30134-1-3	Introduksi	60.	B-961	Kc duduk	Lokal
13.	MLG 2515	MLG 2521	Lokal	61.	B-4299	Lok. Bogor	Lokal
14.	B-4283	Singgalang	Lokal	62.	B-3728	Hibrida	Lokal
15.	B-4200 (II) 30104-1-3	30134-1-3	Introduksi	63.	B-3233	Ked Kecipir putih	Lokal
16.	B-3547 317/986	317/986	Lokal	64.	B-4226	Lok. Bima Kuning	Lokal
17.	B-3508	Lokal Kediri	Lokal	65.	B-1459	Samarinda	Lokal
18.	B-959	Jacson	Introduksi	66.	B-4297	Ceneng	Lokal
19.	B-3695	MLG 2827	Lokal	67.	B-3469	B-3469	Belum diketahui
20.	4216 17/18/5/3/0	17/18/5/3/0	Belum diketahui	68.	4194	Lok. Ongko-2	Lokal
21.	B-4316	MLG 3184	Lokal	69.	B-887	Genjah Slawi	Lokal
22.	B-3695	Lokal Tabanan	Lokal	70.	B-3187	Kepet	Lokal
23.	GM 4476 si	Lokal Sukamandi	Lokal	71.	3692	Lok. Badung	Lokal
24.	3900	LB-72	Lokal	72.	B-1248	Davros	Varietas unggul
25.	B-3774	MLG 2996	Lokal	73.	B-4378	Tanggamus	Varietas unggul
26.	4200(I)30104-1-3	30104-1-3	Introduksi	74.	B-4376	Menyapa	Varietas unggul
27.	3705 Lok. Kr Asem	Lokal Kr. Asem	Lokal	75.	B-4377	Sibayak	Varietas unggul
28.	B-3594	Lokal Kr. Asem	Lokal	76.	B-3853	Krakatau	Varietas unggul
29.	B-4306	No. 556	Belum diketahui	77.	B-3851	Malabar	Varietas unggul
30.	MLG 3102	MLG 3102	Lokal	78.	B-452	Sumbing	Varietas unggul
31.	B-3494	Papak	Lokal	79.	B-4368	Kawi	Varietas unggul
32.	B-1320A	York Sorbean	Introduksi	80.	B-621	Petek	Varietas unggul
33.	B-3661	Presi	Lokal	81.	B-4370	Mahameru	Varietas unggul
34.	B-3601	Lokal Ponorogo	Lokal	82.	B-4372	Sindoro	Varietas unggul
35.	B-3417 (I)	1004/1343-68-9	Belum diketahui	83.	B-4373	Argomulyo	Varietas unggul
36.	GM 4596 si	GM 4596 si	Lokal	84.	B-4374	Lawit	Varietas unggul
37.	B-3657	Lokal Jember	Lokal	85.	B-3462	Tambora	Varietas unggul
38.	B-3628	AVRDC G.2120-MG	Introduksi	86.	B-4371	Anjasmoro	Varietas unggul
39.	B-3677	AVRDC G.2120-MG	Introduksi	87.	B-4369	Merapi	Varietas unggul
40.	B-4373 MLG 2627	MLG 2627	Lokal	88.	B-4375	Nanti	Varietas unggul
41.	B-3702 MLG 2830	Lokal Kr. Asem	Lokal	89.	B-1400	Dempo	Varietas unggul
42.	MLG 2981	MLG 2981	Lokal	90.	B-16	Otau	Varietas unggul
43.	MLG 3092	MLG 3092	Lokal	91.	B-4367	Leuser	Varietas unggul
44.	B-3731 MLG 2883	MLG 2883	Lokal	92.	B-3469	Dieng	Varietas unggul
45.	1658 Sopeng	Sopeng	Lokal	93.	B-4283	Singgalang	Varietas unggul
46.	B-3293	Genjah	Lokal	94.	B-3854	Tampomas	Varietas unggul
47.	B-27	Seleksi Otan	Introduksi	95.	B-3461	Kerinci	Varietas unggul
48.	B-3469	Dieng	Belum diketahui	96.	B-3458	Tidar	Varietas unggul

Tabel 2. Kode dan sekuen dari pasangan 10 primer SSR yang digunakan dalam penelitian.

Primer SSR	Forward	Reverse
Satt009	CCAAGTTGAAATTACTAGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAACCCCTT
Satt038	GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT	GGGCATTGAAATGGTTTTAGTGA
Satt114	GGGTTATCCTCCCAATA	ATATGGGATGATAAGGTGAAA
Satt147	CCATCCCCTCCTCCAAATAGAT	CTTCCACACCCTAGTTTAGTGACAA
Satt177	CGTTTCATTCCCATGCCAATA	CCCGCATCTTTTTCAACCAC
Satt242	GCGTTGATCAGGTCGATTTTTATTTGT	GCGAGTGCCAACTAACTACTTTTATGA
Satt243	GCGCATTGCACATTAGGTTTTCTGTT	GCGGTAAGATCACGCCATTATTTAAGA
Satt294	GCGGGTCAAATGCAAATTATTTTT	GCGCTCAGTGTAAGTTGTTTTCTAT
Satt308	GCGTTAAGGTTGGCAGGTTGGAAGTG	GCGCAGCTTTATACAAAAATCAACAA
Satt414	GCGTATTCCTAGTCACATGCTATTTCA	GCGTCATAATAATGCCTAGAACATAAA

bedaan sebesar 0,5°C setiap siklusnya, kemudian diikuti dengan 27 siklus pada suhu 55°C.

6. *Final extension* (perpanjangan basa untuk putaran terakhir) pada suhu 72°C selama 5 menit dengan satu siklus.
7. Inkubasi pada suhu 4°C selama satu jam, dan pada tahap akhir dilakukan inkubasi pada suhu 10°C (terutama apabila proses PCR dilakukan semalam (*overnight*)). Langkah ini diambil untuk menghindari kerusakan mesin PCR akibat inkubasi pada suhu ekstrim yang cukup lama.

Persiapan Sampel untuk *Loading* dan *Running* Produk PCR pada CEQ 8000

Penyiapan sampel produk PCR untuk *loading* dan *running* pada mesin CEQ mengikuti protokol baku dari Thompson (2004). Produk PCR dalam satu panel dicampur dengan komposisi tertentu sesuai dengan besarnya sinyal fluorescen yang dihasilkan dalam SLS (*sample loading solution*), dan ditambahkan DNA standar 400 bp yang merupakan standar internal yang berwarna merah (pada layar monitor berupa puncak-puncak). Setelah *loading* sampel dalam alat CEQ, proses pengoperasiannya dilakukan sesuai dengan protokol. *Running* dapat dilakukan sekaligus secara otomatis terhadap 96 sampel DNA dalam waktu 11-12 jam dan fragmen-fragmen DNA (*peaks*) yang dihasilkan dapat dilihat pada layar monitor. Berdasarkan standar internal, ukuran fragmen DNA yang diperoleh dapat ditentukan secara akurat. Seluruh kegiatan yang berkaitan dengan penggunaan CEQ ini dilakukan di Laboratorium Litbang Biotek Terpadu, BB-Biogen.

Optimasi *Multiplexing* pada CEQ 8000

Optimasi dilakukan untuk tiap panel *multi-plexing* yang telah dirancang untuk masing-masing komoditi, dengan menggunakan empat sampel DNA yang dipilih secara random. Dari hasil optimasi ini diperoleh nilai ekuivalen yang paling optimum untuk masing-masing primer dalam suatu panel. Hasil optimasi ini selanjutnya akan digunakan untuk melakukan *running* semua sampel bahan penelitian.

Analisis Data

Tahapan analisis data adalah sebagai berikut:

- a. **Penentuan ukuran fragmen DNA (*allele calling*).** Hal ini dilakukan untuk mengetahui ukuran fragmen DNA dari hasil *running* beberapa sampel dalam CEQ, hasil *running* selanjutnya diolah dengan *CEQ Fragment Analysis Software*. Berdasarkan ukuran fragmen yang tampak pada layar monitor CEQ 8000 *genetic analyzer*, maka pola potongan

DNA (sidik jari) untuk masing-masing varietas yang diuji dapat diketahui.

- b. **Pengelompokan fragmen-fragmen DNA (alel-alel) dalam kategori tertentu (*binning*).** *Binning* dilakukan pada data alel yang telah terkumpul dari semua aksesori. Proses *binning* didasarkan pada motif dari *repeat* yang diapit oleh setiap pasang markah SSR yang digunakan (misalnya 2, 3, atau 4 basa). Karena minimnya informasi sekuen markah SSR kedelai pada saat ini, maka proses *binning* dilakukan terlebih dahulu terhadap alel-alel dengan frekuensi tinggi. Ukuran alel yang diperoleh dari proses *binning* ini merupakan sidik jari DNA dari seluruh aksesori yang diuji dengan seluruh markah yang digunakan dan selanjutnya dapat disimpan sebagai dasar acuan dan pengembangan pangkalan data untuk tujuan identifikasi varietas.
- c. **Analisis keragaman genetik.** Pada tahap selanjutnya data yang dihasilkan dari proses *binning* dapat dianalisis menggunakan *software PowerMarker* sehingga dapat diketahui seberapa besar tingkat keragaman genetik dan seberapa dekat hubungan kekerabatan antara aksesori yang satu dengan aksesori lainnya. Salah satu kelebihan *PowerMarker* dalam hal ini adalah, selain *output* berupa dendrogram, dapat diperoleh parameter numerik yang menunjukkan besarnya keragaman genetik dari plasma nutfah yang diteliti.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tanaman kedelai, ukuran baku (standar) yang biasanya digunakan untuk tujuan perlindungan varietas tanaman adalah pigmentasi dan beberapa sifat morfologi tambahan. Namun demikian, pada saat ini banyak varietas kedelai komersial yang hanya dihasilkan dari galur-galur elit yang jumlahnya terbatas sehingga seringkali varietas-varietas tersebut tidak dapat dibedakan dengan hanya berdasarkan sifat-sifat tersebut (Diwan dan Cregan 1997). Dalam situasi seperti ini, peran identifikasi varietas menggunakan markah molekuler sangat bermanfaat.

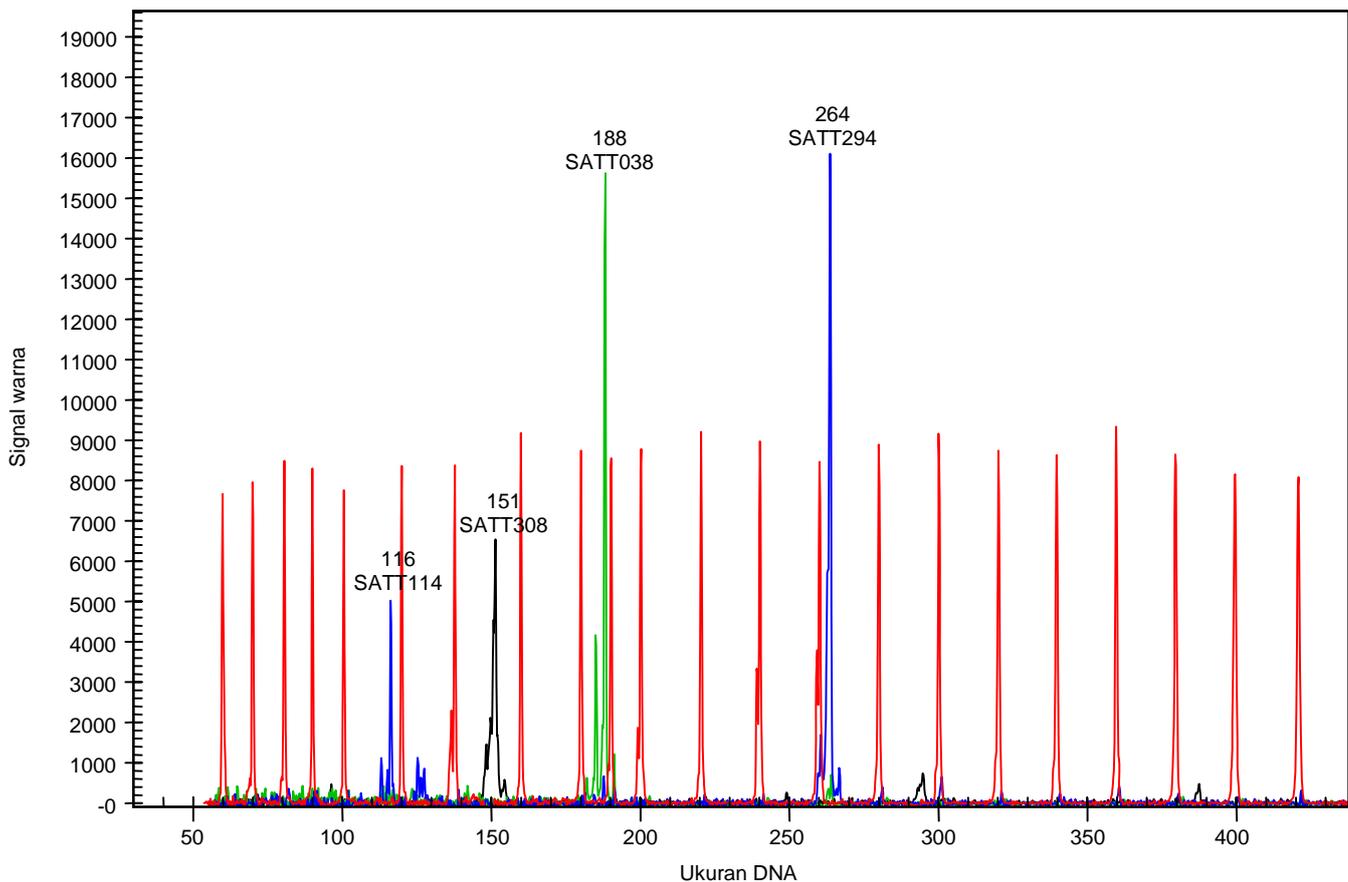
Dalam penelitian ini, sebagai penelitian pendahuluan atau rintisan untuk tanaman kedelai, hanya digunakan 10 markah SSR dan 96 aksesori kedelai. Untuk keperluan *multiplexing*, kesepuluh markah tersebut dibagi menjadi tiga panel berdasarkan nilai ekuivalen dari masing-masing primer (signal warna dan ukuran DNA), yaitu panel 1 terdiri atas 4 markah (SATT308, SATT038, SATT114, dan SATT242), panel 2 terdiri dari 4 markah (SATT147, SATT243, SATT414, dan SATT294) dan panel 3 terdiri dari 2 markah (SATT009 dan SATT177). Contoh sampel DNA kedelai yang di-*running*

dengan Beckman CEQ 8000 dapat dilihat pada Gambar 1.

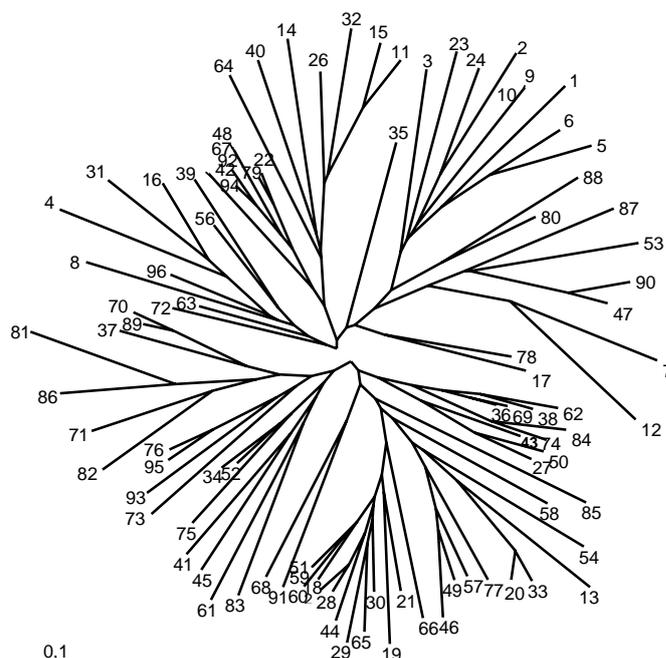
Setelah ukuran alel diperoleh dari perangkat lunak (*software*) CEQ, diperlukan analisis data lebih lanjut dengan menggunakan program *PowerMarker*. Data 96 varietas yang telah diuji dengan menggunakan 10 markah SSR dapat dikelompokkan dalam grup atau klaster (Gambar 2). Dalam penelitian ini baik akses-aksesi *outgroup* (aksesi-aksesi liar) maupun akses-aksesi kontrol internasional (terutama dari kawasan Asia Timur) tidak diikutsertakan karena tidak tersedia dalam koleksi. Oleh karena itu, hubungan kekerabatan dari plasma nutfah yang diuji dengan plasma nutfah yang berasal dari pusat keragaman genetik utama (kawasan Asia Timur) tidak dapat diketahui. Namun demikian, dapat dilihat kecenderungan bahwa varietas-varietas unggul yang diuji cenderung mengelompok dalam klaster-klaster tertentu, misalnya No. 76 (Krakatau), No. 95 (Kerinci), No. 93 (Singgalang), dan No. 73

(Tanggamus). Daftar nama akses-aksesi dan ukuran fragmen DNA-nya dapat dilihat pada Tabel 3. Hal ini menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan di antara varietas-varietas unggul tersebut. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar varietas unggul kedelai yang dibudidayakan pada saat ini, khususnya yang terdapat di koleksi plasma nutfah BB-Biogen memiliki keragaman genetik yang relatif sempit. Hal ini akan mempersulit program seleksi varietas kedelai. Di masa-masa mendatang, program pemuliaan untuk menghasilkan varietas unggul kedelai perlu mempertimbangkan keragaman genetik plasma nutfah dari tetua yang akan digunakan dalam persilangan, bahkan apabila perlu dapat memanfaatkan gen-gen penting yang mungkin tersembunyi dalam kerabat liar tanaman kedelai.

Dengan 10 markah SSR yang digunakan dapat dideteksi perbedaan genetik dua nomor akses-aksesi kedelai berbeda yang mempunyai nama sama, misalnya



Gambar 1. Signal fluorescen yang dihasilkan dari mesin Beckman CEQ 8000. Signal warna (*dye*) ada di ordinat Y (*Y-axis*), ukuran DNA ada di ordinat X (*X-axis*; dalam nukleotida, nt). Puncak-puncak (*peaks*) warna merah adalah ukuran DNA standar (60 nt-420 nt). Puncak-puncak yang lain adalah markah SSR yang digunakan dalam panel (warna hitam, hijau, dan biru). Dalam panel 1, ukuran pita DNA dari sampel nomor 8, akses-aksesi kedelai nomor 3665, yaitu salah satu akses-aksesi lokal Pasuruan (2 biru, 1 hijau, dan 1 hitam) tampak pada layar monitor, dengan nama markah yang digunakan beserta ukuran alelnya.



Gambar 2. Dendrogram yang dihasilkan oleh program *PowerMarker* dari 96 aksesori kedelai dengan menggunakan 10 markah SSR.

Tabel 3. Ukuran alel, jumlah alel, frekuensi alel utama, heterosigositas, diversitas gen, dan tingkat polimorfisme (*polymorphism information content*, PIC) yang diperoleh dari 96 sampel kedelai.

Panel	Markah SSR	Ukuran alel (bp)	Jumlah alel	Frekuensi alel utama	Heterosigositas	Diversitas Gen	PIC
1	SATT308	118-172	12	0,3421	0,0316	0,7998	0,7757
1	SATT038	157-191	10	0,3263	0,0000	0,8211	0,8014
1	SATT114	79-107	7	0,4740	0,0104	0,6181	0,5460
1	SATT242	103-160	10	0,4375	0,1250	0,6603	0,5971
2	SATT147	190-326	12	0,6421	0,0421	0,5573	0,5317
2	SATT243	261-295	11	0,2708	0,0000	0,8105	0,7846
2	SATT414	268-314	13	0,4239	0,0000	0,7481	0,7203
2	SATT294	253-300	14	0,5000	0,0100	0,7061	0,6830
3	SATT009	142-245	19	0,2500	0,0104	0,8629	0,8494
3	SATT177	105-117	8	0,3177	0,0208	0,7746	0,7405
Rata-rata		167,6-222,7	11,6	0,3984	0,0251	0,7359	0,7030

aksesi No. 15 dan 26. Namun ada juga aksesori yang mempunyai nama berbeda, tetapi mempunyai identitas genetik yang sama, seperti aksesori No. 9 dan 10. Dalam penelitian ini, aksesori No. 48, 67, dan 92 mempunyai kesamaan genetik karena ternyata dalam penyediaan benih, secara tidak sengaja, nomor aksesori yang sama terambil tiga kali. Dengan demikian, markah yang digunakan dapat mendeteksi heterogenitas dalam satu aksesori dan dapat pula mengidentifikasi kemungkinan duplikasi dalam koleksi. Informasi ini sangat bermanfaat dalam upaya perbaikan pengelolaan plasma nutfah agar lebih efektif dan efisien.

Keragaman genetik yang tinggi dapat dideteksi dari 96 sampel DNA dengan menggunakan 10 markah SSR (Tabel 2). Sebanyak 116 alel dapat diidentifikasi

dengan rerata 11,6 alel per lokus dan kisaran antara 7-19 alel per lokus. Jumlah alel per lokus yang terendah dideteksi oleh SATT114, sedangkan jumlah alel tertinggi dideteksi oleh SATT 009. Rerata frekuensi alel utama (dominan) adalah 39,84%, dengan nilai terendah 25% diidentifikasi oleh SATT009 dan nilai tertinggi 64,21% oleh SATT147, dari seluruh sampel yang diuji. Rerata nilai diversitas gen adalah 0,7359 dengan nilai terendah 0,5573 ditunjukkan oleh SATT147 dan nilai tertinggi 0,8629 oleh SATT009. Nilai PIC yang merupakan refleksi dari nilai frekuensi dan keragaman alel, menunjukkan rerata yang cukup tinggi (0,7030). Nilai PIC terendah (0,5573) dideteksi oleh SATT147, sedangkan nilai tertinggi (0,8629) dideteksi oleh SATT009. Alel dengan frekuensi <5 individu (<5% dari total sampel) di-

kelompokkan sebagai alel yang jarang (*rare alleles*), dalam penelitian ini terdapat 58 alel yang jarang ditemukan (data tidak disajikan). Alel yang jarang ditemukan dapat berpotensi besar apabila berkaitan dengan gen-gen penting yang bermanfaat. Di samping itu, ada kemungkinan alel-alel tersebut merupakan koleksi dari plasma nutfah yang masih belum dimanfaatkan.

Walaupun hanya dengan menggunakan 10 markah SSR saja keragaman genetik yang cukup tinggi dapat diketahui dan sebagian besar plasma nutfah yang diuji sudah dapat dibedakan satu sama lain, walaupun jumlah ini sebenarnya belum mencukupi. Agar tingkat diskriminatif dari markah atau kemampuan untuk mengetahui keragaman genetik dari aksesi plasma nutfah lebih tinggi, paling tidak diperlukan 20 markah SSR yang mempunyai tingkat polimorfisme tinggi. Diwan dan Cregan (1997) melaporkan bahwa dengan 20 SSR dan materi 35 aksesi, menggunakan keragaman genetik dari kultivar modern, dapat diketahui di mana secara morfologis, baik berdasarkan pigmentasi maupun sifat-sifat lainnya tidak dapat dibedakan. Di samping itu, mereka juga dapat membedakan 7 genotipe yang semula tidak dapat dibedakan satu sama lain dengan 17 RFLP. Dengan demikian, apabila urgensi identifikasi keragaman genetik varietas kedelai pada tahun-tahun mendatang menjadi lebih tinggi, maka penelitian lanjutan dengan menggunakan markah SSR yang lebih banyak sangat diperlukan. Di samping itu, dalam penelitian juga perlu diikutsertakan beberapa aksesi kedelai liar sebagai *outgroup* dan aksesi kontrol sehingga diperoleh sidik jari DNA yang diperlukan untuk keperluan identifikasi varietas dan juga data klusterisasi yang jelas untuk studi keragaman genetik.

KESIMPULAN

Hasil analisis parameter diversitas genetik plasma nutfah kedelai menunjukkan bahwa 116 alel teridentifikasi, dengan rerata 11,6 alel per lokus, berkisar antara 7-19, rerata nilai diversitas gen adalah 0,736, sedangkan nilai PIC adalah 0,703.

Penggunaan 10 markah SSR pada 96 aksesi kedelai dapat mendeteksi perbedaan genetik di antara 2 aksesi yang mempunyai nama sama dengan nomor aksesi yang berbeda, yaitu aksesi No. 15 dan No. 26 maupun yang mempunyai nama berbeda tetapi mempunyai identitas genetik yang sama, yaitu aksesi No. 9 dan No. 10. Markah yang digunakan dapat mendeteksi adanya heterogenitas dalam satu aksesi dan dapat pula mengidentifikasi adanya kemungkinan duplikasi dalam koleksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurachman, A., A. Mulyani, dan H. Sastramihardja. 1999.** Peluang perluasan areal pertanaman kedelai untuk mendukung Gema Palagung 2001. Strategi Pengembangan Produksi Kedelai. Prosiding Lokakarya Pengembangan Kedelai Nasional. Puslitbangtan Bogor. hlm. 23-26.
- Blair, M.W., O. Panaud, and S.R. McCouch. 1999.** Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780-792.
- 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. Wickaert, L. Bertrand, and B. Vosman. 2002.** Construction and testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Diwan, N. and P.B. Cregan. 1997.** Automated sizing of fluorescently-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybeans. *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.
- Panaud, O., X. Chen, and S.R. McCouch. 1996.** Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252:597-607.
- Thompson, M.J. 2004.** Microsatellite fragment sizing on the CEQ 8000: BB-Biogen standard operating procedure series. Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development. Bogor, Indonesia. p. 1-10.
- Van Eeuwijk, F.A. and C.P. Baril. 2001.** Conceptual and statistical issues related to the use of molecular markers for distinctness and essential derivation. *Proc. Int. Symp. on Molecular Markers*. Eds. Doré, Dosba & Baril. *Acta Hort.* 546:35-53.
- Wu, K.S. and S.D. Tanksley. 1993.** Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241:225-235.
- Xu, D.H., J. Abe, J.Y. Gai, and J. Shimamoto. 2002.** Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: Evidence of multiple origins of cultivated soybeans. *Theor. Appl. Genet.* 105:6.
- Yang, G.P., M.A.S. Maroof, C.G. Xu, Q. Zhang, and R.M. Biyashev. 1994.** Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245:187-194.