

Journal
**TANAMAN INDUSTRI
 DAN PENYEGAR**
 Journal of Industrial and Beverage Crops
 Volume 5, Nomor 3, November 2018

**EVALUASI KESERAGAMAN KLONAL PADA ENAM KLON KAKAO UNGGUL
 BERDASARKAN MARKA SSR**

*EVALUATION OF CLONAL UNIFORMITY IN SIX SUPERIOR CACAO CLONES
 BASED ON SSR MARKER*

* Indah Sulistiyorini¹⁾, Rubiyo²⁾, dan Sudarsono³⁾

¹⁾ **Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar**

Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

* *i_sulistiyorini@yahoo.com*

²⁾ **Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian**

Jalan Tentara Pelajar No 10. Bogor 16114 Indonesia

³⁾ **Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor**

Jalan Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

(Tanggal diterima: 2 Mei 2018, direvisi: 7 Juli 2018, disetujui terbit: 30 November 2018)

ABSTRAK

Perbanyakan bahan tanam unggul kakao umumnya dilakukan secara vegetatif (klonal). Oleh karena itu, tanaman yang diperbanyak secara klonal harus memiliki keseragaman genetik. Keseragaman 135 genetik dalam klon kakao juga sangat penting untuk konservasi plasma nutfah dan mendapatkan tetua persilangan yang murni. Evaluasi keseragaman genetik dapat diketahui melalui marka *simple sequence repeats* (SSR). Tujuan penelitian adalah mengetahui keseragaman genetik pada enam klon kakao unggul berdasarkan marka SSR. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar, Sukabumi dan Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, IPB, Bogor mulai bulan September 2015 sampai Desember 2016. Enam klon kakao yang digunakan adalah TSH 858, TSH 908, ICS 13, PA 300, GC 7, dan UIT yang berasal dari Kebun Percobaan Kalitelepak PTPN XII, Kecamatan Genteng, Banyuwangi, Jawa Timur. Sepuluh tanaman sampel diambil dari masing-masing klon secara acak untuk isolasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan 12 marka SSR. Hasil penelitian menunjukkan 12 marka SSR yang digunakan menghasilkan 45 alel dengan jumlah alel per lokus adalah 3–4 alel. Nilai *polymorphic information content* (PIC) berkisar 0,37–0,67 yang tergolong sangat informatif untuk mengidentifikasi keragaman genetik populasi kakao. Hasil analisis menunjukkan bahwa enam primer SSR menghasilkan pola pita yang tidak seragam pada klon TSH 858 dan UIT yang mengindikasikan adanya *off type* sebanyak 8,33%, sedangkan pada empat klon kakao yang lain (GC 7, ICS 13, PA 300, dan TSH 908) lebih seragam secara genetik.

Kata kunci: Kakao, keseragaman genetik, klon, marka SSR

ABSTRACT

Propagation of cacao plants is generally carried out vegetatively. Therefore, plants that are clonally propagated should be genetically uniform. Genetic uniformity in cacao clones is also very important information for germplasm conservation and in obtaining pure parental crosses. Evaluation of genetic uniformity can be seen through analysis using SSR markers. This study aimed to determine the genetic uniformity in six cacao clones using SSR markers. This experiment was conducted at IIBCRI Integrated Laboratory in Sukabumi and Plant Molecular Biology Laboratory, IPB Bogor, from September 2015 to December 2016. Six cacao clones used (TSH 858, TSH 908, ICS 13, PA 300, GC 7 and UIT) are from Kalitelepak experimental station of PTPN XII, Genteng District, Banyuwangi, East Java. Ten samples were taken randomly to represent cacao clones. DNA

amplification was carried out using 12 SSR markers. The result showed that 12 SSR markers generated 45 alleles with the number of alleles per locus was 3-4 alleles. The polymorphic information content (PIC) ranges from 0.37–0.67, which are identified as very informative molecular analysis in identifying the genetical uniformity of the evaluated cacao population. Six SSR loci generated variant alleles within both the TSH 858 and UIT clones, indicating there are off-type plants in these two samples. Clonal uniformity was detected for samples of the GC 7, ICS 13, PA 300 and TSH 908 clones. On the other hand, 8.33% of evaluated samples within the TSH 858 and UIT clones were off-type plants.

Keywords: Cacao, clone, genetic uniformity, SSR markers

PENDAHULUAN

Peningkatan produktivitas dan mutu biji kakao memerlukan ketersediaan bahan tanaman yang unggul dan bermutu. Hal itu dapat dilakukan melalui perbanyakan secara vegetatif dan generatif. Pada umumnya, penyediaan bahan tanam dilakukan secara vegetatif, melalui okulasi, setek, sambung samping, sambung pucuk, dan kultur jaringan (Ardiyani & Yuliasmara, 2015). Perbanyakan vegetatif terbentuk dari sel somatik berdasarkan pada pembelahan sel secara mitosis dan menghasilkan dua sel anak yang memiliki sifat dan jumlah kromosom yang sama dengan induknya. Tanaman yang diperbanyak secara vegetatif (klonal) mempunyai susunan genetik yang identik dan stabil (Syukur, Sujiprihati, & Yunianti, 2015).

Klon-klon unggul kakao banyak dimanfaatkan sebagai tetua untuk menghasilkan hibrida maupun sebagai sumber entres. Kebun entres merupakan sumber pertama bahan entres yang harus mempunyai kemurnian 100% (Permentan, 2013). Kebun kakao Kalitelepak milik PTPN XII yang berlokasi di Genteng, Banyuwangi, Jawa Timur merupakan salah satu kebun kakao yang memiliki beberapa koleksi klon unggul yang dimanfaatkan sebagai sumber entres. Klon-klon kakao yang digunakan sebagai sumber entres harus dijaga kemurniannya dengan cara mengamati karakter morfologi tanaman. Klon kakao yang murni dapat ditunjukkan melalui kestabilan dan keseragaman genetik klon tersebut. Informasi kestabilan genetik suatu klon sangat penting diketahui untuk memastikan homogenitas genetik dari suatu tanaman, menjaga karakteristik klon tersebut, serta untuk konservasi plasma nutfah yang digunakan sebagai sumber perbanyakan secara massal (Cruz-Martínez *et al.*, 2017). Mahdi, Hare, Maliheh, Mohsen, & Mahdih (2015) menyebutkan identifikasi keseragaman dan kestabilan tanaman dapat diketahui dengan penanda (marka) genetik yaitu marka morfologi, marka biokimia (isozim), dan marka DNA (molekuler). Dari ketiga penanda tersebut, penanda molekuler memiliki keuntungan antara lain bersifat stabil dan dapat dideteksi dalam semua jaringan tanaman serta tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Simple sequence repeats (SSR) atau mikrosatelit merupakan salah satu penanda DNA berbasis PCR. SSR terdiri atas pengulangan beberapa basa nukleotida, berupa dinukleotida, trinukleotida, atau tetranukleotida, yang tersebar disepanjang genom kebanyakan spesies eukariotik. SSR dapat ditemukan pada genom inti sel, mitokondria, dan kloroplas yang tersebar secara acak (Powell, Machray, & Provar, 1996). Kelebihan marka mikrosatelit adalah jumlahnya banyak di dalam genom tanaman, bersifat polimorfik, mudah dideteksi dengan PCR, waktu deteksi yang dibutuhkan singkat, bersifat *co-dominan*, dan membutuhkan DNA dalam jumlah sedikit. Selain itu, marka mikrosatelit juga mampu membedakan individu yang heterozigot maupun homozigot (Kalia, Rai, Kalia, Singh, & Dhawan, 2011).

Marka SSR telah banyak dimanfaatkan oleh para peneliti, di antaranya untuk identifikasi duplikasi dan kesalahan pelabelan pada koleksi plasma nutfah kakao (Saunders, Mischke, & Leamy 2004) dan untuk mengidentifikasi keaslian klon kakao pada kebun koleksi plasma nutfah di Malaysia (Johnsiul & Awang 2016). Selain itu, marka SSR juga dimanfaatkan untuk mendeteksi keseragaman dan kestabilan genetik pada beberapa tanaman, antara lain pada kelapa sawit untuk pengendalian mutu dalam memproduksi klon kelapa sawit pada skala komersial (Singh, Nagappan, Tan, Panandam, & Cheah, 2007), tanaman tebu hasil kultur jaringan (Pandey, Singh, Rastogi, Sharma, & Singh, 2012), tanaman anggur (Nookaraju & Agrawal, 2012), dan tanaman kelapa hasil kultur jaringan (Bandupriya *et al.*, 2017). Pada tanaman kakao, proses identifikasi keseragaman dan kemurnian genetik selama ini masih banyak dilakukan berdasarkan karakter morfologi yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler perlu dilakukan untuk mengetahui keseragaman dan kemurnian genetik tanaman kakao yang diperbanyak secara klonal.

Penelitian bertujuan mengetahui keseragaman genetik pada enam klon kakao unggul di kebun koleksi Kalitelepak PTPN XII Genteng, Banyuwangi, Jawa Timur, berdasarkan marka SSR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri), Sukabumi dan Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Desember 2015 sampai Juni 2016.

Materi Tanaman

Sampel tanaman kakao yang digunakan adalah enam klon kakao unggul, yaitu ICS 13, GC 7, PA 300, TSH 858, TSH 908, dan UIT yang berasal dari Kebun Koleksi Kalitelepak PTPN XII, Banyuwangi, Jawa Timur. Klon kakao tersebut merupakan hasil okulasi dengan batang bawah berasal dari benih komposit yang telah berumur 24 tahun. Tanaman kakao tersebut ditanam secara poliklonal dengan jarak tanam 2,5 x 2,5 m. Pada 10 tanaman sampel masing-masing klon diambil daun muda secara acak untuk isolasi DNA.

Isolasi DNA dan Penentuan Kualitas DNA

Isolasi DNA dilaksanakan di Laboratorium Terpadu, Balittri menggunakan metode

cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Allen, Flores-Vergara, Krasynanski, Kumar, & Thompson, 2006; Rogrio *et al.*, 2014). Dari kedua metode tersebut dilakukan modifikasi dengan menambahkan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) pada proses ekstraksi DNA. Daun muda dari masing-masing sampel ditimbang kurang lebih 0,3–0,35 g, dihaluskan dengan mortar dengan menambahkan nitrogen cair kemudian ditambahkan 0,05 g PVP, 5 µl 2-mercaptoetanol, dan 1,5 ml buffer ekstrak (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8,0, dan 20 mM EDTA).

DNA hasil isolasi diuji kualitas dan kuantitasnya untuk melihat konsentrasi dan kemurnian DNA. Pengujian kualitas DNA menggunakan elektroforesis gel agarose bertujuan mengetahui DNA yang dihasilkan tidak banyak terkontaminasi oleh protein, lemak, karbohidrat, polyvenol, dan kontaminan lainnya. DNA yang tidak terkontaminasi akan menghasilkan garis pita yang bersih. Sementara pengujian kuantitas DNA dilakukan menggunakan nanodrop 2000 spectrophotometer. DNA yang mempunyai nilai rasio A260/A280 antara 1,8–2 menunjukkan tidak ada kontaminasi RNA sehingga dapat digunakan untuk proses selanjutnya, yaitu amplifikasi DNA.

Tabel 1. Marka SSR yang digunakan untuk analisis keseragaman genetik enam klon kakao unggul

Table 1. SSR markers used in analyzing genetic uniformity of six superior cacao clones

Nama Lokus	Urutan basa nukleotida primer SSR	Jumlah basa	Ukuran alel	Suhu penempelan (°C)
mTcCIR 69	F: GGACATCGGTGTTCATCAG	20	208	55,6
	R: TGCTATGAGATTGAAAGAGAATTGA	25		52,4
mTcCIR 76	F: GAAAATGGGGGTCTTTTGGT	20	196	53,3
	R: AGGCGAAGAGGGAGAAGAAG	20		56,3
mTcCIR 82	F: GCAATCATGTGCCCCCTTCTA	20	206	55,2
	R: AAGCTTATTGCGGAAGGACA	20		54,5
mTcCIR 145	F: TGGAAGGCTGTCCAAAATTC	20	241	50,2
	R: TGTTTGTGTCTGGCTTTTGC	20		49,7
mTcCIR 155	F: CTTAGAGGCTTGTGCCGTGA	20	197	57,2
	R: GCCATGCCAATTCCAATAA	20		51,7
mTcCIR 190	F: CTGAAGCACAAATTATCCATCAA	23	172	53,7
	R: CCAATTGCTCCACAAAGAGC	20		54,6
mTcCIR 209	F: TGTCTTCACATAAGCCATGA	21	243	53,8
	R: TGTTGCCCTTCCTTGTTAGG	20		55,0
mTcCIR 213	F: GATCTCGCAAACTAACA	18	261	47,1
	R: TAAGTAAAATGAAGGTGTGA	20		46,3
mTcCIR 251	F: TCATGCCCAAGTGACACAAAT	20	228	54,8
	R: AATGGACTGGAGCATGGAAG	20		54,9
mTcCIR255	F: GCCTTACAGCATTCCCATGA	20	193	55,2
	R: ATCTGCAGGACTTGGACCAC	20		57,1
mTcCIR 268	F: TGTAATCCAAATAATAAGCAT	21	316	44,9
	R: CAGTGAAGAGGCAAGAGA	18		51,3
mTcCIR 291	F: TTGCAATTGTCCCAAGCATA	20	212	52,8
	R: ATGTCAAGCATGGCAGTGTT	20		55,3

Sumber : Kurniasih *et al.*, 2011

Source: Kurniasih *et al.*, 2011

Analisis Marka SSR

Sampel DNA kakao diamplifikasi menggunakan 12 primer SSR yang dikembangkan oleh Lanaud *et al.*, (1999) dan Pugh *et al.* (2004) yang telah didesain ulang urutan nukleotidnya oleh Kurniasih, Rubiyo, Setiawan, Purwantara, & Sudarsono (2011) (Tabel 1). Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR (*thermal cycler*). Total volume reaksi PCR adalah 15 µl terdiri dari 2 µl DNA *template* (konsentrasi 10 ng), 0,3 µl primer mix (*forward* dan *reverse*) dengan konsentrasi 10 pmol, 7,5 µl PCR mix (Kapa Biosystems Inc., USA) dan ditambah dengan *ultra purewater* (ddH₂O) steril hingga mencapai volume akhir total 15 µl.

Proses PCR dimulai dengan denaturasi awal (94°C; 3 menit), diikuti 35 siklus dimulai dengan denaturasi (94°C; 15 detik), *annealing* (53–55°C; 15 detik), dan perpanjangan (*extension*) (72°C; selama 15 detik). Tahap terakhir adalah perpanjangan akhir (*final extension*) (72°C selama; 10 menit) dan pendinginan (*cooling*) (16°C; 5 menit). Evaluasi hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 1%.

DNA hasil amplifikasi PCR diseparasi dengan teknik elektroforesis menggunakan gel akrilamid 6% yang mengandung Urea. Produk PCR diambil sebanyak 2 µl dan ditambahkan 3 µl *loading buffer* (10mM EDTA, 98% formaldehyde, 0,01% xylene cyanol, 0,01% bromophenol blue), kemudian dihomogenkan dan didenaturasi (94°C; 10 menit). Proses elektroforesis dilakukan selama 2,5 jam pada mesin elektroforesis Cole-Parmer®Dedicated Height Sequencers (3000 volt; 300 mA; 65 Watt).

Pemisahan produk PCR divisualisasikan dengan pewarnaan perak nitrat yang telah dimodifikasi (Creste, Neto, & Figueira, 2001). Proses pewarnaan terdiri atas lima tahapan. Tahap pertama adalah fiksasi gel selama 10 menit dengan cara membilas kaca menggunakan aquades selama 1 menit. Tahap kedua adalah merendam kaca dengan *nitrit acid* selama 3 menit, kemudian dibilas dengan aquades selama 1 menit. Tahap ketiga adalah pewarnaan perak nitrat selama 20 menit, kemudian ditambahkan larutan *developing* (1,5 ml formaldehid dan 200 µl sodium thiosulfate) sebelum proses pewarnaan berakhir. Selanjutnya, kaca dicuci dengan aquades secara cepat sekitar 5–10 detik. Tahap keempat yaitu tahap *developer* selama 5–7 menit sampai muncul pita pada kaca. Tahap kelima adalah *reaction stop* selama 5 menit, kemudian kaca dicuci selama 5 menit menggunakan aquades sebanyak 1 liter. Setelah pewarnaan, kaca dikeringanginkan dan didokumentasikan.

Skoring dan Analisis Data

Skoring dilakukan terhadap posisi alel hasil amplifikasi PCR untuk masing-masing lokus SSR. Hasil skoring kemudian dianalisis dengan menggunakan software Cervus 2.0 (Marshall, Slate, Kruuk, & Pemberton, 1998) untuk mendapatkan data alel frekuensi, *polymorphic information content* (PIC), *observed heterozygosity* (Ho), dan *Expected heterozygosity* (He). Selain itu, juga dilakukan analisis gerombol (*clustering analysis*) menggunakan software *Dissimilarity Analysis and Representation for WINDOWS* (DARwin) v.6 (Perrier & Jacquemoud-Collet., 2010) dan indeks disimilaritas (*genetic distance*) untuk menduga keseragaman dalam klon kakao.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Marka SSR

Marka SSR merupakan marka multi alel sehingga dapat diperoleh informasi mengenai jumlah alel dari setiap primer yang digunakan. Hasil analisis menggunakan 12 marka SSR menghasilkan alel sebanyak 45 alel (Tabel 2), dengan rata-rata jumlah alel sebanyak 3,5 per lokus. Jumlah alel yang dihasilkan pada penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, meskipun menggunakan marka SSR yang sama (Kurniasih, Rubiyo, Setiawan, & Sudarsono, 2011; Rubiyo, Izzah, Sulistiyorini, & Tresniawati, 2015); Wicaksono, Rubiyo, Sukma, & Sudarsono, 2017). Perbedaan jumlah alel yang dihasilkan dengan penelitian sebelumnya diduga disebabkan perbedaan jenis populasi yang digunakan dalam penelitian. Sebagai contoh lokus mTcCIR 155 menghasilkan 4 alel pada penelitian ini, namun pada penelitian yang dilakukan Kurniasih *et al.*, (2011) menghasilkan 8 alel, dan pada penelitian Rubiyo *et al.*, (2015) menghasilkan 3 alel.

Nilai PIC yang dihasilkan dalam penelitian ini 0,37–0,67 (Tabel 2). Nilai PIC merupakan nilai suatu marka yang menunjukkan polimorfisme pada sebuah populasi. Nilai PIC ditentukan berdasarkan jumlah alel yang terdeteksi dan distribusi frekuensinya. Jumlah variasi alel dan frekuensinya tergantung dari keragaman genetik pada populasi yang diamati (Nagy *et al.*, 2012). Mateescu *et al.* (2005) mengkategorikan nilai PIC menjadi 3 kelompok yaitu sangat informatif (>0,60), cukup informatif (0,30–0,59), dan tidak informatif (<0,30). Primer mTcCIR 69, mTcCIR 209, mTcCIR 213, dan mTcCIR 251 yang digunakan dalam penelitian ini diketahui mempunyai nilai PIC dengan kategori sangat informatif, sedangkan primer yang lainnya termasuk kategori cukup informatif. Marka dengan kategori nilai PIC sangat informatif dapat dimanfaatkan untuk analisis keragaman genetik pada populasi kakao lainnya.

Ditinjau dari nilai heterozigositas, primer mTcCIR 251 mempunyai nilai H_o tertinggi (1,00), sedangkan primer mTcCIR 255 mempunyai nilai H_o terendah (0,28) (Tabel 2). Nilai H_o menunjukkan jumlah penyebaran gen atau alel yang diamati pada suatu populasi. Marka yang mempunyai nilai H_o lebih besar dari H_e menunjukkan bahwa lokus tersebut memiliki tingkat H_o yang tinggi (Govindaraj, Vetriventhan, & Srinivasan, 2015). Primer dengan nilai H_o tinggi berpeluang lebih besar untuk mendeteksi lebih banyak alel yang terdapat pada suatu populasi tanaman.

Pendugaan parameter genetik juga dilakukan pada masing-masing klon kakao. Hasil analisis menunjukkan nilai H_o pada semua klon lebih tinggi dibanding nilai H_e (Tabel 3). Hal itu menunjukkan bahwa klon-klon tersebut mempunyai tingkat

heterozigositas yang tinggi. Tingkat H_o yang tinggi pada klon kakao dipengaruhi oleh sifat tanaman kakao yang menyerbuk silang. Hasil penelitian terdahulu menyatakan bahwa populasi tanaman yang mempunyai nilai H_o tinggi merupakan materi genetik unggul karena mempunyai keragaman alel yang tinggi yang diperlukan dalam program pemuliaan (Izzah *et al.*, 2013). Selain itu, tingkat H_o yang tinggi juga berpengaruh pada teknik perbanyakan tanaman yang ideal. Hasil pendekatan molekuler membuktikan bahwa teknik perbanyakan yang direkomendasikan pada tanaman kakao adalah secara vegetatif (klonal), agar diperoleh bibit yang seragam dan bermutu. Pada penelitian ini juga ditemukan adanya alel spesifik yang hanya ditemukan pada klon PA 300 (0,25) dan UIT (0,17) (Tabel 3).

Tabel 2. Karakteristik berbagai primer mTcCIR berdasarkan jumlah alel per primer (Na), *Polymorphic Information content* (PIC), heterozigositas yang diamati (H_o) dan heterozigositas harapan (H_e) yang dihasilkan dari 12 lokus SSR

Table 2. Characteristics of some mTcCIR primers based on number of alleles per primer (Na), *Polymorphic Information content* (PIC), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) generated from 12 SSR loci

Nama primer	Na	PIC	H_o	H_e
mTcCIR 69	4	0.68	0.66	0.74
mTcCIR 76	3	0.37	0.51	0.41
mTcCIR 82	3	0.45	0.81	0.54
mTcCIR 145	4	0.51	0.83	0.58
mTcCIR 155	4	0.55	0.83	0.60
mTcCIR 190	3	0.59	0.83	0.67
mTcCIR 209	4	0.65	0.65	0.71
mTcCIR 213	4	0.67	0.78	0.73
mTcCIR 251	4	0.65	1.00	0.71
mTcCIR 255	3	0.44	0.28	0.55
mTcCIR 268	3	0.50	0.83	0.57
mTcCIR 291	3	0.59	0.35	0.67
Rata-rata	3.5	0.55	0.62	0.62

Keterangan : Na = Jumlah alel per primer, PIC = *Polymorphic Information content*, H_o = heterozigositas yang diamati
 H_e = heterozigositas harapan yang dihasilkan dari 12 lokus SSR

Note : Na = The number of primer alleles, PIC = *Polymorphic Information content*, H_o = observed heterozygosity, H_e = promising heterozygosity generated from 12 loci

Tabel 3. Karakteristik enam klon kakao berdasarkan marka SSR

Table 3. Characteristics of six cacao clones based on SSR markers

Nama Klon	Jumlah alel (Na)	alel efektif (Ne)	alel spesifik	H_o	H_e
TSH 858	2.00	1.80	0.00	0.418	0.398
TSH 908	1.58	1.58	0.00	0.307	0.291
ICS 13	1.92	1.92	0.00	0.482	0.458
PA 300	1.33	1.33	0.25	0.175	0.167
UIT	2.17	2.02	0.17	0.501	0.476
GC 7	1.75	1.75	0.00	0.395	0.375

Keterangan : Na = jumlah alel, Ne = rata-rata jumlah alel spesifik, H_o = nilai heterozigositas harapan, H_e = heterozigositas teramat pada masing-masing klon kakao berdasarkan 12 marka SSR

Note : Na = The number of alleles, Ne = average of specific alleles, H_o = promising heterozygosity, H_e = observed heterozygosity of each cacao clones based on 12 SSR markers

Kedua alel spesifik ini dapat digunakan untuk membedakan kedua klon tersebut dari klon kakao yang lain. Dengan demikian, alel spesifik ini dapat dimanfaatkan untuk program perlindungan tanaman dan pengujian *Distinctness, uniformity, and stability* (DUS) (Izzah *et al.*, 2013).

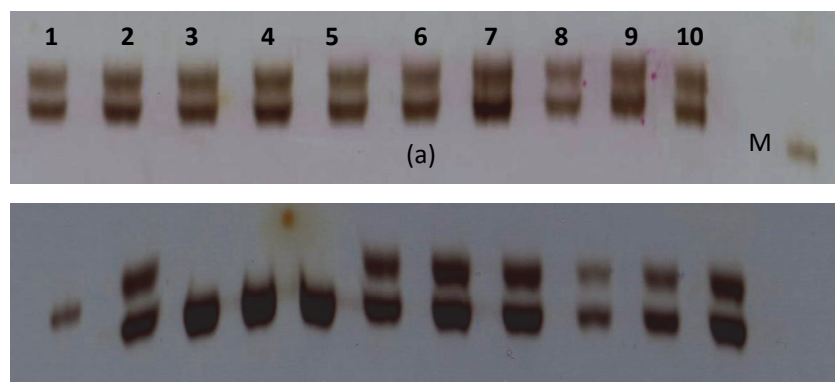
Analisis Keseragaman Genetik Klon Kakao

Keseragaman di dalam klon kakao secara molekuler dapat dilihat berdasarkan pola pita yang dihasilkan pada masing-masing marka SSR. Pola pita yang dihasilkan marka SSR tersebut menunjukkan posisi alel dari keenam sampel DNA kakao yang digunakan. Analisis keseragaman genetik pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif perlu dilakukan untuk menjamin tersedianya benih yang seragam dan bermutu. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Bandupriya *et al.* (2017) yang mendapatkan planlet kelapa hasil somatik embriogenesis dengan pola pita seragam berdasarkan marka SSR, dan mengindikasikan bahwa plantlet tersebut merupakan *true-to type*. Pada penelitian ini, 12 marka SSR yang digunakan berhasil mendeteksi keseragaman pola pita semua sampel tanaman pada empat klon kakao, yaitu klon GC 7, ICS 13, PA 300, dan TSH 908. Sementara pada dua klon yang lain (TSH 858 dan UIT) hanya enam marka SSR yang menghasilkan pola pita seragam pada semua sampel tanaman, sedangkan enam marka yang lain (primer mTcCIR 76, mTcCIR 82, mTcCIR 291, mTcCIR 145, mTcCIR 213, dan mTcCIR 255) menghasilkan pola pita tidak seragam. Marka SSR yang menghasilkan pola pita seragam dan tidak seragam pada enam klon kakao dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer mTcCIR 76 dan mTcCIR 82 menghasilkan pola pita

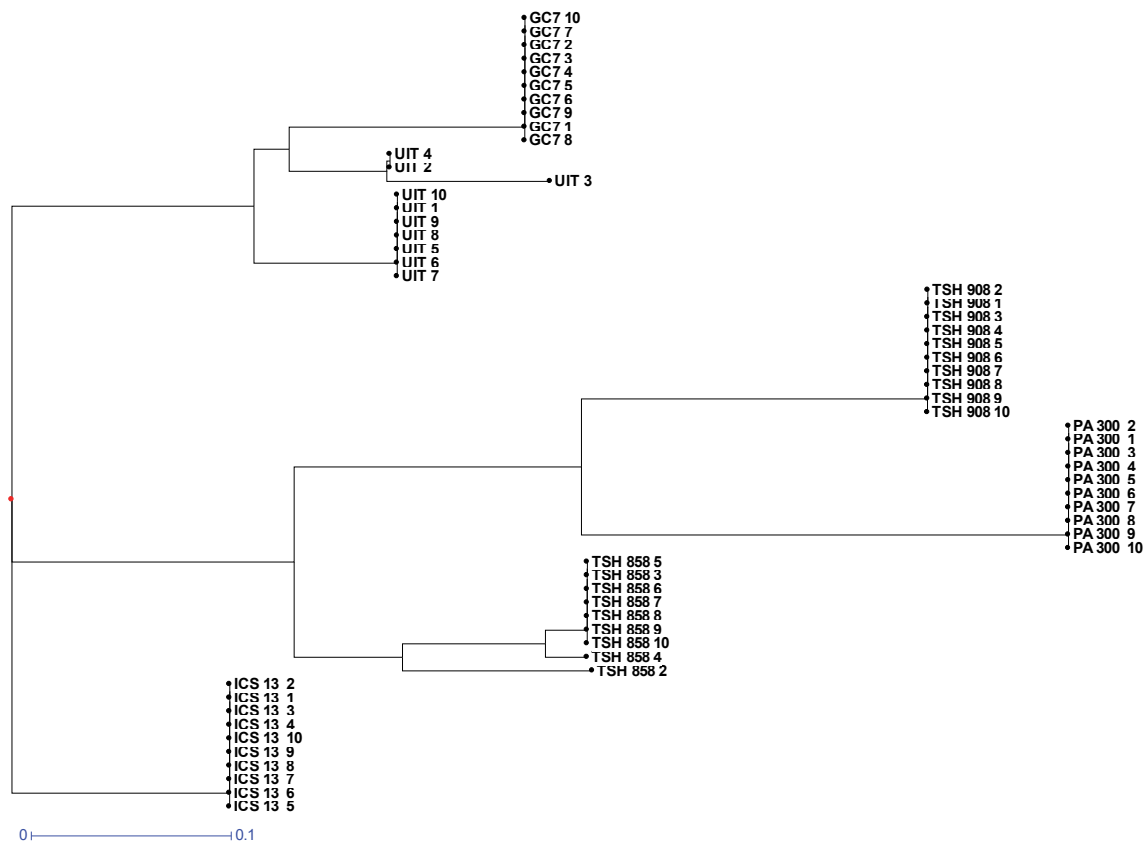
tidak seragam pada sampel tanaman nomor 2 dari klon TSH 858. Primer mTcCIR 291 menghasilkan pola pita berbeda pada sampel tanaman nomor 3. Sedangkan primer mTcCIR 255 dan mTcCIR 213 menghasilkan pola pita berbeda pada sampel tanaman nomor 2, 3, 4 dari klon UIT, dan primer mTcCIR 145 menghasilkan pola pita berbeda pada sampel tanaman nomor 3. Dengan demikian, jumlah sampel tanaman kakao yang teridentifikasi menghasilkan pola pita tidak seragam adalah 8,33% dari 60 sampel yang digunakan. Hasil penelitian ini membuktikan kemampuan marka SSR dalam mendeteksi ketidakseragaman di dalam klon TSH 858 dan UIT.

Klon merupakan bagian dari suatu tanaman tunggal yang melakukan diferensiasi secara mitosis sehingga tidak terjadi perubahan susunan genetik. Perbedaan yang muncul dalam suatu klon kemungkinan disebabkan oleh pengaruh faktor lingkungan, namun pengaruhnya tidak diwariskan pada generasi selanjutnya (Syukur *et al.*, 2015). Hasil analisis keseragaman genetik dengan menggunakan program DARwin v.6 menunjukkan adanya perbedaan keseragaman genetik pada beberapa klon kakao yang diuji (Gambar 2). Sepuluh sampel tanaman dari masing-masing klon GC 7, ICS 13, PA 300, dan TSH 908 terlihat mengelompok pada satu garis, yang menunjukkan sampel tanaman tersebut mempunyai tingkat kemiripan genetik 100%. Namun demikian, dua sampel daun tanaman dari klon TSH 858 terlihat tidak mempunyai kemiripan genetik 100% dengan 8 tanaman lain, hal yang sama juga terjadi pada tiga sampel daun tanaman klon UIT. Berdasarkan hasil analisis keseragaman genetik menunjukkan pada klon TSH 858 dan UIT terdapat tanaman *off-type*.



Gambar 1. Contoh alel hasil amplifikasi menggunakan primer mTcCIR 291 yang menghasilkan pita seragam (a) dan primer mTcCIR 255 yang menghasilkan pita tidak seragam pada sampel no. 2, 3, 4 dari klon UIT (b); no. 1-10: sampel DNA tanaman kakao; M: DNA ladder 200 bp.

Figure 1. Alleles profile generated from amplification of mTcCIR 291 primer that produced uniform bands (a) and mTcCIR 255 primer that showed variant allele on samples no. 2, 3, and 4 of UIT clone (b); number 1-10: DNA samples of cacao plant; M: 200 bp DNA ladder



Gambar 2. Dendrogram 60 tanaman kakao klonal yang berasal dari enam klon kakao berbeda (GC 7, UIT, TSH 858, PA 300, TSH 908, dan ICS 13) berdasarkan 12 marka SSR. Dendrogram dihasilkan dengan menggunakan metode *clustering* UPGMA.

Figure 2. Dendrogram of 60 clonal cacao plants derived from six cacao clones (GC 7, UIT, TSH 858, PA 300, TSH 908 dan ICS 13) based on 12 SSR markes. The dendrogram was generated using UPGMA clustering method.

Tanaman *off type* (tipe simpang/klon lain) adalah tanaman atau benih yang menyimpang dari sifat-sifat suatu varietas di luar batas kisaran yang telah ditetapkan (Permentan, 2013). Kehadiran tanaman *off-type* ini merupakan sumber yang sangat berperan dalam kontaminasi genetik karena kehadiran mereka yang secara terus menerus akan menurunkan kemurnian genetik dari varietas atau klon tersebut. Kehadiran tanaman *off-type* dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adanya perubahan sifat genetik atau mutasi genetik, terjadinya penyerbukan yang tidak dikehendaki saat produksi benih, tercampur dengan benih lain, kesalahan dalam pengambilan entres, atau kesalahan pelabelan. Tanaman *off type* yang terdapat pada klon TSH 858 dan UIT diduga karena adanya kesalahan dalam pengambilan entres pada proses okulasi atau pemberian label yang salah pada sumber entres. Johnsiul

& Awang (2016) menyebutkan dalam kebun koleksi plasma nutfah kakao kemungkinan dapat terjadi kesalahan pelabelan atau memberikan label yang salah karena penilaian fenotipik yang tidak pasti. Ketidakseragaman genetik pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif juga dapat disebabkan oleh variasi somaklonal terutama pada tanaman yang diperbanyak melalui kultur jaringan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Cahyaningsih, Wiendi, & Toruan-Mathius (2016) yang menyebutkan 5%–55% ramet berbeda dengan ortetnya karena proses kultur jaringan kelapa sawit melalui fase kalus, yang merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya variasi antara ramet dan ortet.

Adanya tanaman *off-type* yang ditemukan pada 60 sampel tanaman kakao dalam penelitian ini memberikan informasi penting untuk melakukan

pemurnian kebun koleksi yang digunakan sebagai tempat pengambilan sampel penelitian. Informasi dari hasil penelitian ini juga mengindikasikan kemungkinan adanya tanaman *off-type* lainnya pada populasi tanaman kakao yang terdapat pada kebun koleksi. Oleh karena itu, penggunaan marka molekuler sangat direkomendasikan untuk menunjang pemurnian kebun induk ataupun kebun entres agar dapat mendeteksi adanya ketidakseragaman dalam masing-masing klon yang mirip secara fenotip.

KESIMPULAN

Dua belas marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini berhasil mendeteksi keseragaman genetik dari klon GC 7, ICS 13, PA 300, dan TSH 908 sedangkan pada klon TSH 858 dan UIT ditemukan pola pita tidak seragam, yang ditunjukkan oleh primer mTcCIR 76, mTcCIR 82, mTcCIR 291, mTcCIR 255, mTcCIR 213, dan mTcCIR 145. Marka SSR yang menghasilkan pola pita tidak seragam terbukti sangat efektif untuk mengidentifikasi adanya tanaman *off-type* (sebanyak 8,33%) pada kedua klon tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Zikril Illahi, M.Si, Januar Firmansyah, SP, dan Tribuana Dewi yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium. Terimakasih juga kami sampaikan kepada Nur Kholilatul Izzah SP., MP.,Ph.D yang telah memberikan masukan dan saran dalam melaksanakan penelitian dan penulisan KTI. Ucapan terima kasih kepada Badan Litbang Pertanian atas program beasiswa tugas belajar tahun anggaran 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, G., Flores-Vergara, M., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat. Prot.*, 1(5), 2320–2325.
<https://doi.org/doi:10.1038/nprot.2006.384>
- Ardiyani, F., & Yuliasmara, F. (2015). Perbanyak tanaman kakao. In T. Wahyudi, Pujiyanto, & Misnawi (Eds.), *Kakao :Sejarah, Botani, Proses Produksi, Pengolahan, dan Perdagangan* (p. Hal 727). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Bandupriya, H. D. D., Iroshini, W. W. M. A., Perera, S. A. C. N., Vidhanaarachchi, V. R. M., Fernando, S. C., Santha, E. S., & Gunathilake, T. R. (2017). Genetic fidelity testing using ssr marker assay confirms trueness to type of micropropagated *Coconut* (L.) plantlets derived from unfertilized ovaries. *The Open Plant Science Journal*, 10(1), 46–54.
<https://doi.org/10.2174/1874294701710010046>
- Cahyaningsih, Y. F., Wiendi, N. M. A., & Toruan-Mathius, N. (2016). Deteksi kestabilan genetik ramet kelapa sawit hasil kultur in vitro menggunakan ssr detection of genetic stability in ramet of oil palm derived from in vitro culture by SSR. *J.Agron. Indonesia*, 44(1), 83–90.
- Creste, S., Neto, A. T., & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(4), 299–306.
<https://doi.org/10.1007/BF02772828>
- Cruz-Martínez, V., Castellanos-Hernández, O. A., Acevedo-Hernández, G. J., Torres-Morán, M. I., Gutiérrez-Lomeli, M., Ruvalcaba-Ruiz, D., ... Rodríguez-Sahagún, A. (2017). Genetic fidelity assessment in plants of *Sechium edule* regenerated via organogenesis. *South African Journal of Botany*, 112, 118–122.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.020>
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances : An overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International*, 2015, 1–15.
- Izzah, N. K., Lee, J., Perumal, S., Park, J. Y., Ahn, K., Fu, D., ... Yang, T.-J. (2013). Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups. *Genet Resour Crop Evol*, 60, 1967–1986.
<https://doi.org/10.1007/s10722-013-9966-3>
- Johnsiul, L., & Awang, A. (2016). Utilization of molecular markers to detect the authenticity of cocoa clones. *International Journal of Agriculture, Forestry and Plantation*, 3(June), 101–104.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309–334.
<https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
- Kurniasih, S., Rubiyo, Setiawan, A., Purwantara, A., & Sudarsono. (2011). Analisis keragaman genetik plasma nutfah kakao (*Theobroma cacao* L.) berdasarkan marka SSR. *Jurnal Littri*, 17(4), 156–162.

- Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., & Lagoda, P. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology*, 8, 2141–2152.
- Mahdi, A., Hare, K., Maliheh, E., Mohsen, M., & Mahdieh, M. (2015). Assessment of clonal fidelity in micropropagated horticultural plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12), 977–990.
- Marshall TC, Slate, J., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural population. *Mol. Ecol.*, 7(5), 639–655.
- Mateescu, R. G., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Burton-Wurster, N. I., Lust, G., ... Todhunter, R. J. (2005). Analysis of allele fidelity, polymorphic information content, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *Journal of Heredity*, 96(7), 847–853. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi109>
- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedus, G., & Taller, J. (2012). PICcalc: An online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical Genetics*, 50(9–10), 670–672. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9509-1>
- Nookaraju, A., & Agrawal, D. C. (2012). Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *South African Journal of Botany*, 78, 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.08.009>
- Pandey, R. N., Singh, S. P., Rastogi, J., Sharma, M. L., & Singh, R. K. (2012). Early assessment of genetic fidelity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantlets regenerated through direct organogenesis with RAPD and SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 6(4), 618–624.
- Permentan. (2013). *Standar Operasional Prosedur Penetapan Kebun Sumber Benih, Sertifikasi Benih, dan Evaluasi Kebun Sumber Benih Tanaman Kakao ((Theobroma cacao L.))*.
- Perrier, X., & J.P., J.-C. (2010). DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Powell, W., Machray, G. C., & Provar, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7), 215–221.
- Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, A. M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C., ... Lanaud, C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant marker: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1151–1161. https://doi.org/DOI_10.1007/s00122-003-1533-4
- Rogrio, M. F. S., Uilson, V. L., Didier, C., Jose, L. P., Eline, M. L., Tamiles, B. M., & Karina, P. G. (2014). A protocol for large scale genomic DNA isolation for cacao genetics analysis. *African Journal of Biotechnology*, 13(7), 814–820. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13181>
- Rubiyo, Izzah, N. K., Sulistiyorini, I., & Tresniawati, C. (2015). Evaluation of genetic diversity in cacao collected from Kolaka, Southeast Sulawesi, using SSR markers. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 16(2), 71–78.
- Saunders, J. A., Mischke, A. E. S., & Leamy, A. E. A. (2004). Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1762-1>
- Singh, R., Nagappan, J., Tan, S., Panandam, J. M., & Cheah, S. (2007). Development of simple sequence repeat (SSR) markers for oil palm and their application in genetic mapping and fingerprinting of tissue culture clones. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 15(3), 121–131.
- Syukur, M., Sujiprihati, S., & Yuniarti, R. (2015). *Teknik Pemuliaan Tanaman*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wicaksono, I. N., Rubiyo, Sukma, D., & Sudarsono. (2017). Analisis Keragaman genetik 28 nomor koleksi kakao (*Theobroma cacao* L.) berdasarkan marka SSR. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 4(1), 13–22.

