

Analisis Sidik Jari DNA Varietas Tanaman Pangan

Endang M. Septiningsih, Tri J. Santoso, Dwinita W. Utami, dan Nurul Hidayatun

ABSTRAK

Pada tahun anggaran 2004 telah dilakukan identifikasi varietas secara molekuler dengan menggunakan marka SSR (*simple sequence repeat*) berlabel flouresen terhadap 96 aksesi padi, ubi jalar, dan kedelai menggunakan alat DNA *genetic analyzer* berbasis elektroforesis kapiler. Dengan teknologi ini, ukuran fragmen DNA yang diperoleh dapat dibaca lebih akurat, pengoperasian alat lebih otomatis, dan *high-throughput*. Pembacaan fragmen yang akurat sangat diperlukan terutama dalam usaha identifikasi varietas untuk keperluan konformasi, registrasi, dan dalam rangka perlindungan varietas tanaman (PVT). Di samping itu, karakterisasi plasma nutfah secara umum dapat digunakan untuk studi keragaman genetik dan identifikasi alel atau gen yang bermanfaat untuk perbaikan tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hampir semua aksesi yang digunakan mempunyai sidik jari DNA atau identitas genetik yang unik. Alel-alel jarang (frekuensi <5%) yang dapat mempunyai potensi penting dalam program perbaikan tanaman juga terdeteksi dalam penelitian ini. Klasterisasi yang sangat jelas terlihat dari hasil penelitian terhadap 96 aksesi padi dengan menggunakan 30 marka SSR, yaitu kelompok kerabat liar, Japonica, dan Indica. Sebanyak 305 alel terdeteksi, berkisar antara 4-22 per lokus. Di samping itu, dapat pula diidentifikasi alel-alel yang spesifik untuk masing-masing klaster, maupun kombinasi dari dua klaster ataupun lebih terdeteksinya alel-alel yang spesifik untuk klaster tertentu dapat membantu dalam menentukan marka SSR mana yang dapat digunakan dalam suatu populasi hasil persilangan. Rerata nilai diversitas gen adalah 0,612, sedangkan nilai PIC (*polymorphism information content*) adalah 0,581. Hasil analisis 96 aksesi ubi jalar dengan 10 SSR menunjukkan bahwa tidak ada keterkaitan antara aksesi dengan daerah asal, kecuali aksesi dari Papua. Kelompok plasma nutfah Wamena mendominasi klaster yang berbeda dengan kelompok Manokwari. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya kombinasi antara perbedaan material plasma nutfah pada waktu pertama kali introduksi dan isolasi geografis, yang mengakibatkan adanya peningkatan jarak genetik di antara keduanya. Sebagian plasma nutfah dari kedua daerah tersebut juga ditemukan tersebar di klaster-klaster lain. Hal ini menunjukkan tingginya tingkat keragaman genetik plasma nutfah yang berasal dari daerah Papua, yang memberikan dukungan data secara molekuler bahwa Papua merupakan pusat sekunder keragaman genetik plasma nutfah ubi jalar dunia. Untuk tanaman kedelai, hasil analisis menggunakan 10 SSR terhadap 96 aksesi kedelai menunjukkan bahwa 116 alel dapat teridentifikasi, berkisar antara 7-19 alel per lokus, dengan nilai PIC 0,703. Varietas unggul yang digunakan cenderung mengelompok dalam klaster tertentu secara bersama-sama yang menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan di antara varietas unggul tersebut. Selain itu, terdeteksi perbedaan genetik di antara dua aksesi yang mempunyai nama sama dengan nomor aksesi yang berbeda, sebaliknya terdeteksi pula aksesi yang mempunyai nama berbeda ternyata mempunyai identitas genetik yang sama.

Kata kunci: Identifikasi varietas, keragaman genetik, padi, ubi jalar, kedelai, SSR berlabel flouresen, elektroforesis kapiler.

ABSTRACT

In the fiscal year of 2004, variety identification of a set of rice, sweet potato, and soybean accessions had been completed using fluorescently-labeled SSR (*simple sequence repeat*) markers on a capillary-electrophoresis DNA genetic analyzer. Based on this technology, DNA fragment sizes can be more accurately measured and the genotyping protocol can be automated in a high-throughput manner. Accuracy is an important issue for variety identification, especially for variety conformation, registration, and plant protection. In addition, germplasm as a whole can be further analyzed to measure the amount of the genetic diversity and to identify agronomically-important genes or alleles for variety improvement. The results of this study showed that nearly all of the accessions used have unique DNA fingerprints or genetic identities. The rare alleles (frequency <5%) that might have the potential in the variety improvement program efforts had been detected as well. The results of an analysis of 96 rice accessions based on 30 SSRs showed 3 distinct clusters, i.e. wild relatives, *Japonica*, and *Indica* groups. As many as 305 alleles, ranging between 4-22 alleles per locus, were detected. Additionally, alleles that were specific to certain groups or combinations of different groups were identified. The relatedness of some alleles to certain groups of germplasm could help us to decide which SSR markers will be useful to analyze populations derived from crosses between two parents. The average value of the gene diversity is 0.612, and the PIC (*polymorphism information content*) value is 0.581. The analysis of the 96 sweet potato accessions using 10 SSRs demonstrated that there was no association between accessions and their geographical origins, except the ones originating from Papua, which were represented by two regions, i.e. Wamena and Manokwari. Accessions that originated from Wamena have dominated a different cluster than those of Manokwari. There is a possibility of different founder groups combined

with geographic isolation between the two regions causing increased genetic distance. Some accessions originating from these two regions have also been found in other different clusters. This phenomenon demonstrated the high level of genetic diversity of sweet potato germplasm originated from Papua. The results of this study also provided additional evidence that Papua is a secondary center for the world sweet potato genetic diversity. Lastly, the results of the soybean study using 96 accessions and 10 SSRs detected 116 alleles, ranging between 7-19 alleles per locus, with the PIC value of 0.703. There was a tendency for the improved varieties to cluster together in certain groups showing that there were close genetic relationships among them. In addition, molecular differences between 2 accessions having the same names but different numbers of registration were detected. Furthermore, 2 accessions having different names but the same molecular identity were identified.

Key words: Variety identity, genetic diversity, rice, sweet potato, soybean, fluorescently-labeled SSR, capillary electrophoresis.

PENDAHULUAN

Karakterisasi varietas tanaman atau plasma nutfah secara lebih luas menggunakan marka molekuler dapat memberikan hasil yang lebih cepat, efektif, dan akurat dibandingkan dengan karakterisasi berdasarkan morfologi. Beberapa alasan di antaranya karena karakterisasi menggunakan marka tidak dipengaruhi oleh musim; dapat dilakukan pada stadium awal, bahkan dapat dilakukan pada benih sekalipun; tidak bersifat merusak, karena hanya dibutuhkan sedikit sampel; dan tidak bias oleh faktor lingkungan. Selanjutnya baik karakterisasi berdasarkan marka molekuler maupun morfologi dapat digunakan bersama dan saling melengkapi.

Pada saat ini marka yang digunakan secara luas adalah SSR (*simple sequence repeat*) atau mikrosatelit. Marka ini banyak digunakan pada berbagai studi, termasuk di antaranya adalah studi keragaman genetik ataupun identifikasi varietas (Blair *et al.* 1999; Bredemeijer *et al.* 2002). SSR merupakan *tandem arrays* dari 2-5 bp *nucleotid repeats*, yang ditemukan secara luas pada organisme eukariotik. Marka ini bersifat kodominan dan dapat mendeteksi variasi alel yang tinggi (Wu dan Tanksley 1993; Panaud *et al.* 1996). Oleh karenanya, marka ini dapat mendeteksi aksesori berkerabat dekat dengan lebih baik dibandingkan dengan marka molekuler yang lain. SSR dapat dideteksi pada *silver staining PAGE* (*polyacrilamide gel elektroforesis*), namun demikian kalau dana memungkinkan proses deteksi SSR dapat dengan mudah diotomatisasi dengan menggunakan *fluorescently-labeled markers* dan alat *genetic analyzer*. Kelebihan utama dari alat ini adalah pembacaan fragmen DNA yang lebih akurat (teliti sampai 1 bp), lebih otomatis dan *high-throughput* (marka-marka yang berbeda ukuran fragmen DNA dan warna labelnya dapat diproses bersama dalam satu kali *running*).

Identifikasi varietas secara molekuler dapat digunakan sebagai pelengkap atau bahkan alternatif untuk identifikasi varietas secara morfologis. Usaha untuk membuat pangkalan data (database) yang sistematis untuk keperluan identifikasi varietas berdasarkan sidik jari DNA telah dimulai, misalnya untuk tanaman tomat (Bredemeijer *et al.* 2002). Identifikasi varietas dilakukan dalam rangka registrasi dan perlindungan tanaman. Untuk keperluan registrasi diperlukan adanya bukti bahwa varietas tersebut benar-benar baru (*novelty*). Selain itu, diperlukan pula adanya konformasi varietas turunan esensial (*essentially derived varieties*) (van Eeuwijk dan Baril 2001). Dengan adanya jaminan perlindungan tanaman dari pemerintah, diharapkan bisnis pemuliaan di Indonesia akan semakin bergairah, karena iklim ini diharapkan akan memacu, terutama pihak swasta, untuk ikut berperan aktif. Di samping itu, dengan perlindungan yang baik, diharapkan "pencurian" plasma nutfah oleh pihak asing dapat ditekan seminimal mungkin.

Hasil identifikasi *improved varieties* dalam tahap selanjutnya juga dapat digunakan untuk mengetahui besarnya keragaman genetik di antara *improved varieties* sendiri dalam plasma nutfah yang kita koleksi dengan membandingkannya dengan varietas-varietas lokal dan aksesori liarnya. Sebagai contoh pada tanaman padi, saat ini keragaman genetik dari tanaman padi yang kita budidayakan cukup sempit, karena adanya praktek pemuliaan tanaman modern (Yang *et al.* 1994). Hal ini menyebabkan tanaman budi daya kita cukup rentan terhadap cekaman biotik maupun abiotik, yang pada akhirnya mengakibatkan berkurangnya hasil per tahunnya. Salah satu terobosan utama yang dapat kita lakukan untuk mengatasi hal ini adalah dengan memanfaatkan

sebaik mungkin keragaman plasma nutfah yang kita punyai, dan potensi yang ada kita ikut sertakan dalam program perbaikan tanaman. Pada tahun anggaran 2004 telah dilakukan karakterisasi plasma nutfah untuk tanaman padi, kedelai, dan ubi jalar, dengan menggunakan marka SSR berlabel flouresen. Dalam analisis digunakan alat DNA *genetic analyzer*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi varietas/aksesi tanaman padi, ubi jalar, dan kedelai serta untuk mengetahui besarnya keragaman genetiknya.

BAHAN DAN METODE

Seluruh kegiatan laboratorium dilakukan di Laboratorium Litbang Biotek Terpadu dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor. Penanaman benih padi dan kedelai untuk bahan isolasi DNA dilakukan di rumah kaca BB-Biogen, sedangkan daun ubi jalar untuk bahan isolasi DNA diambil dari koleksi plasma nutfah ubi jalar BB-Biogen di Inlitbio Cimanggu, Inlitbio Cikeumeh, dan Inlitbio Pacet serta koleksi milik CIP di IP Muara. Penelitian dilakukan dari Januari sampai Desember 2004.

Pemilihan Aksesori Plasma Nutfah dan Marka SSR

Benih varietas unggul dan padi lokal diperoleh dari BB-Biogen dan Balitpa (Sukamandi), sedangkan varietas kontrol internasional dan semua kerabat liar diperoleh dari koleksi benih yang ada di IRRI (Filipina). Semua padi liar yang didatangkan dari IRRI merupakan hasil koleksi dari beberapa wilayah di Indonesia. Untuk kegiatan penelitian plasma nutfah ubi jalar, hampir semua varietas unggul diperoleh dari koleksi kebun-kebun percobaan BB-Biogen dengan beberapa tambahan dari IP Muara (koleksi CIP). Di samping itu, digunakan juga aksesori lokal dan satu varietas introduksi (Jewel). Aksesori lokal ini merupakan hasil eksplorasi dari beberapa pulau utama di Indonesia, yaitu Irian Jaya (Papua), Jawa, Sumatera, Sulawesi, Bali, dan Flores. Karena Papua telah dikenal sebagai pusat diversitas sekunder untuk ubi jalar, agar dapat dipelajari lebih lanjut, sebagian besar varietas lokal Papua yang menjadi koleksi BB-Biogen digunakan dalam penelitian ini. Untuk kegiatan penelitian plasma nutfah kedelai, sebanyak 96 aksesori telah dipilih, yang sebagian besar merupakan varietas unggul yang menjadi koleksi BB-Biogen, aksesori lokal, dan tambahan berupa varietas introduksi.

Dalam penelitian ini dipilih marka SSR yang posisinya tersebar merata di seluruh genom. Marka-marka tersebut diseleksi dari publikasi penelitian mengenai identifikasi varietas ataupun studi keragaman genetik dari tanaman yang bersangkutan. Pemilihan marka yang baik ini penting mengingat perbedaan ukuran fragmen merupakan kunci utama dalam identifikasi. Karena pada tahun anggaran 2004 prioritas utama dalam penelitian adalah untuk padi, maka telah dipilih 30 marka SSR yang diperkirakan telah mencukupi untuk identifikasi varietas dan analisis keragaman genetik. Sedangkan sebagai tahap awal untuk penelitian ubi jalar dan kedelai, untuk masing-masing komoditas digunakan 10 marka SSR.

Penanaman Benih Bahan Penelitian

Benih aksesori padi dan kedelai yang terpilih ditanam di rumah kaca sebagai bahan untuk isolasi DNA (daun muda). Untuk padi, benih dari aksesori yang terpilih dikecambahkan dan ditanam untuk sementara dalam bak pembibitan di dalam rumah kaca BB-Biogen. Sementara itu, tanah dalam pot pertanaman diolah selama 2 minggu serta dicampur dengan pupuk kandang. Setelah berumur 2-3 minggu, tanaman dipindahkan ke dalam pot. Pemeliharaan dilakukan sesuai rekomendasi untuk budi daya tanaman padi. Sebagai bahan penelitian untuk kedelai, ditanam tiga benih per aksesori dalam *polybag*. Selanjutnya dilakukan penjarangan sehingga tinggal 1 tanaman per aksesori. Pemeliharaan dilakukan sesuai rekomendasi untuk budi daya tanaman kedelai.

Koleksi Daun Sampel

Daun muda (3-5 minggu) tanaman padi atau kedelai berukuran sekitar 2 cm², diambil dari tanaman yang ditumbuhkan di rumah kaca dan dimasukkan dalam eppendorf ukuran 2 ml. Eppendorf yang berisi sampel tersebut kemudian dimasukkan dalam pendingin yang berisi nitrogen cair. Sedangkan untuk ubi jalar, sampel diambil dari pucuk-pucuk daun muda yang kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel. Plastik tersebut kemudian dimasukkan ke dalam pendingin yang berisi es. Selanjutnya daun dioven pada suhu 50°C selama semalam.

Isolasi DNA Sampel

Protokol yang digunakan untuk isolasi DNA adalah protokol yang sudah baku dalam skala miniprep. Untuk isolasi DNA padi adalah menurut protokol yang dikembangkan di Laboratorium McCouch, untuk ubi jalar mengikuti protokol yang dikembangkan oleh Laboratorium Tanaka, sedangkan untuk kedelai digunakan prosedur menurut Doyle dan Doyle (1990). Proses ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen.

Pengecekan Kuantitas dan Kualitas DNA Sampel

Kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh dicek terlebih dahulu dengan *me-running*-nya 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*.

PCR DNA Sampel

Protokol yang digunakan dalam PCR DNA sampel untuk ketiga komoditi adalah protokol *FastStart (Taq DNA Polymerase)* yang sudah dimodifikasi, dan dalam hal ini digunakan marka SSR berlabel fluoresen, dengan warna hitam, hijau atau biru. 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. Step 2-4 diulang sebanyak 13 kali, dengan program *touchdown* (penurunan suhu secara teratur) dengan perbedaan 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, 1 siklus.
7. Inkubasi pada suhu 4°C selama 1 jam, dan pada tahap final dilakukan inkubasi pada suhu 10°C (terutama apabila kegiatan PCR dilakukan *overnight*).

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

Prosedur untuk penyiapan sampel produk PCR untuk di-*loading* dan proses *running*-nya pada mesin CEQ, mengikuti protokol yang telah dibuat standar oleh Thomson (2004). Pada akhirnya, produk PCR dalam satu panel dicampur dengan komposisi tertentu sesuai dengan besarnya signal fluoresen yang dihasilkannya (dalam layar monitor berupa puncak-puncak, *peaks*) dalam SLS (*sample loading solution*), dan ditambahkan standar DNA 400 bp yang merupakan *internal standard* (berwarna merah). Setelah sampel di-*loading* dalam CEQ, proses pengoperasiannya dilakukan sesuai dengan prosedur. Sebanyak 96 sampel dapat di-*running* sekaligus secara otomatis

dan dalam 11-12 jam, fragmen-fragmen DNA (*peaks*) yang dihasilkan dapat dilihat pada layar monitor. Dengan adanya *internal standard*, ukuran fragmen DNA dapat ditentukan secara lebih akurat. Seluruh kegiatan yang berkaitan dengan penggunaan CEQ ini, dilakukan di Laboratorium Litbang Biotek Terpadu, BB-Biogen.

Optimisasi untuk Keperluan *Multiplexing* pada CEQ 8000

Optimisasi dilakukan untuk tiap panel *multiplexing* yang telah didesain untuk masing-masing komoditi, dengan menggunakan 4 sampel DNA yang dipilih secara random. Dari hasil optimisasi ini akan diperoleh nilai ekuivalen yang paling optimum untuk masing-masing primer dalam suatu panel. Hasil optimisasi ini selanjutnya akan digunakan untuk me-*running* semua sampel bahan penelitian.

Analisis Data

Hasil *running* sampel dalam CEQ kemudian diolah dengan CEQ *fragment analysis software* guna mengetahui besarnya ukuran fragmen DNA-nya (*allele calling*). Tahap berikutnya adalah pem-*binning*-an, yaitu pengelompokan fragmen DNA (alel-alel) dalam kategori tertentu berdasarkan motif dari *repeat* yang diapit oleh setiap pasang marka SSR yang digunakan (misalnya 2, 3 atau 4 basa). Ukuran alel yang diperoleh dari proses *binning* ini merupakan sidik jari DNA dari seluruh aksesi yang diuji dengan seluruh marka yang digunakan dan selanjutnya dapat disimpan sebagai dasar acuan dan pengembangan pangkalan data untuk tujuan identifikasi varietas. Selanjutnya data yang dihasilkan dari proses *binning* dapat dianalisis menggunakan software PowerMarker, untuk padi dan kedelai, dan NTSYSpc 2.1 untuk ubi jalar, guna diketahui seberapa besar tingkat keragaman genetik dan seberapa dekat hubungan kekerabatan antara aksesi yang satu dengan aksesi lainnya. Pemilihan software ini disesuaikan dengan tingkat ploidi yang dimiliki masing-masing komoditi, karena dilihat dari model input datanya, PowerMarker hanya dikhususkan untuk menganalisis spesies diploid, sedangkan NTSYS dapat digunakan untuk semua tingkat ploidi. Salah satu kelebihan PowerMarker dalam hal ini adalah, selain *output* berupa dendrogram, dapat diperoleh parameter numerik yang menunjukkan besarnya keragaman genetik dari materi plasma nutfah yang menjadi bahan penelitian.

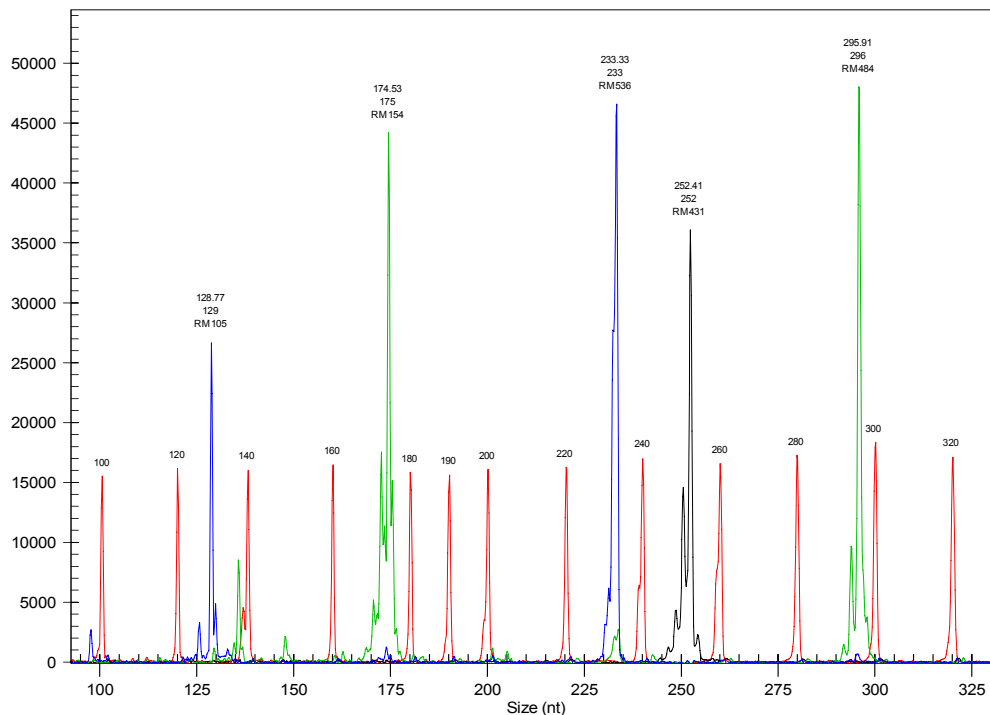
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Sidik Jari DNA Tanaman Padi

Dalam tahun anggaran 2004 ini, padi merupakan prioritas utama penelitian. Sebanyak 30 marka SSR digunakan untuk identifikasi varietas dan sekaligus studi keragaman genetik. Dari beberapa studi yang dilakukan terdahulu, jumlah ini dianggap sudah mencukupi untuk melakukan kegiatan tersebut (Ni *et al.* 2002; Jain *et al.* 2004). Selain untuk keperluan perlindungan varietas atau plasma nutfah padi, data sidik jari DNA dapat digunakan untuk mengontrol kemurnian benih suatu varietas, membuat *core collection*, dan kumpulan data sidik jari DNA dari plasma nutfah yang ada dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antara aksesi yang satu dengan lainnya.

Untuk keperluan *multiplexing*, ketigapuluh marka tersebut telah dibagi menjadi 6 panel, yang masing-masing terdiri dari 5 marka SSR. Hasil *running* produk PCR dengan mesin Beckman CEQ 8000 dapat dilihat di layar monitor, bukan sebagai pita-pita potongan DNA, melainkan berupa puncak-puncak (*peaks*) dengan warna biru, hijau ataupun hitam, sesuai dengan label warna flouresen pada marka yang digunakan. Contoh sampel DNA padi yang di-*running* dengan Beckman CEQ 8000 dapat dilihat pada Gambar 1.

Mesin Beckman CEQ 8000 dapat me-*running* satu set sampel yang terdiri dari 8 buah dalam satu kali siklus dan secara otomatis dapat me-*loading* dan me-*running* 12 set sampel tanpa inter-

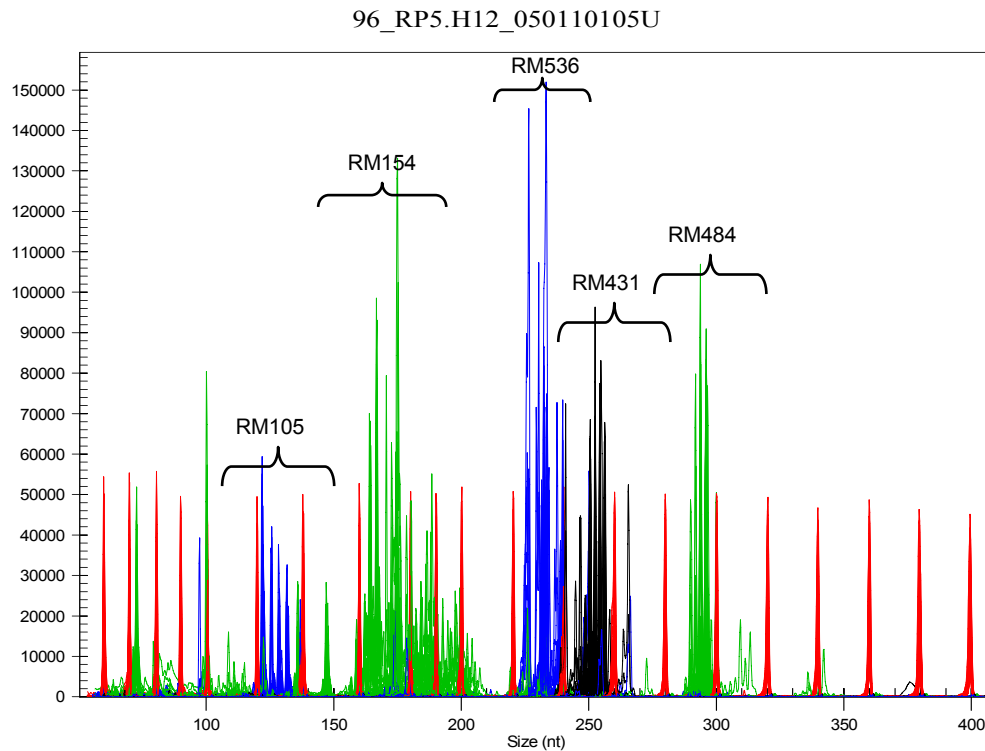


Gambar 1. Signal fluoresen yang dihasilkan dari mesin Beckman CEQ 8000. Signal warna (*dye*) ada di ordinat Y (*Y-axis*), ukuran DNA ada di ordinat X (*X-axis*; dalam nucleotida, nt). Puncak-puncak (*peaks*) warna merah adalah ukuran DNA standard (60 nt-420 nt). Puncak-puncak yang lain adalah marka-marka SSR yang digunakan dalam panel (warna hitam, hijau, dan biru). Pada gambar terlihat ukuran pita-pita DNA dari varietas padi Si Gadis dalam Panel 5 (2 biru, 2 hijau, dan 1 hitam), dengan nama marka yang digunakan beserta ukuran alelnya.

vensi. Dengan demikian, sekali jalan, mesin dapat dioperasikan secara otomatis untuk *loading* dan *running* 96 sampel (waktu yang dibutuhkan sekitar 12 jam). Selanjutnya, software untuk analisis data dari CEQ dapat digunakan untuk menganalisis data yang dihasilkan, melabel puncak-puncak (*peaks*) yang diperoleh, dan untuk mendapatkan ukuran alel dari tiap marka dari aksesori yang digunakan. Salah satu pilihan dari software tersebut adalah menampilkan puncak-puncak yang dihasilkan dari seluruh aksesori dan marka yang digunakan dalam suatu panel, yaitu 96 aksesori dan 5 marka (Gambar 2). Tampilan lain yang dapat dilihat di layar monitor adalah jumlah alel yang terdeteksi oleh suatu marka beserta frekuensinya secara relatif (Gambar 3).

Dari kumpulan data, 96 aksesori padi dan 30 marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini, terlihat bahwa masing-masing aksesori mempunyai sidik jari DNA atau identitas genetik yang unik. Dendrogram yang dihasilkan dari hasil pengolahan data lebih lanjut dengan software Power Marker V3.23 (Gambar 4), juga memberikan klusterisasi yang sangat jelas dari 96 aksesori yang digunakan, yaitu kelompok kerabat liar (*wild species group*) asli Indonesia yang terdiri dari 8 aksesori (1 aksesori *O. longiglumis*, 3 aksesori *O. officinalis*, dan 4 aksesori *O. rufipogon*), Japonica yang terdiri dari 12 aksesori (1 aksesori *Temperate Japonica* yang berasal dari Jepang, yaitu Nipponbare, No. 15, sebagai salah satu kontrol dan 11 aksesori *Tropical Japonica*), sedangkan selebihnya merupakan kelompok Indica. Dari densitas dendrogram, terlihat bahwa kelompok Indica mempunyai tingkat keragaman genetik yang paling tinggi.

Sebanyak 305 alel teridentifikasi, dengan rerata 10,2 alel per lokus, berkisar antara 4-22, dan sebanyak 170 (55,6%) merupakan alel yang jarang terdapat (<5%). Nilai PIC, yang merupakan refleksi dari nilai frekuensi dan keragaman alel, menunjukkan rerata yang cukup tinggi, yaitu 0,581, dengan kisaran antara 0,296 dan 0,851. Di samping itu, dapat pula diidentifikasi alel-alel



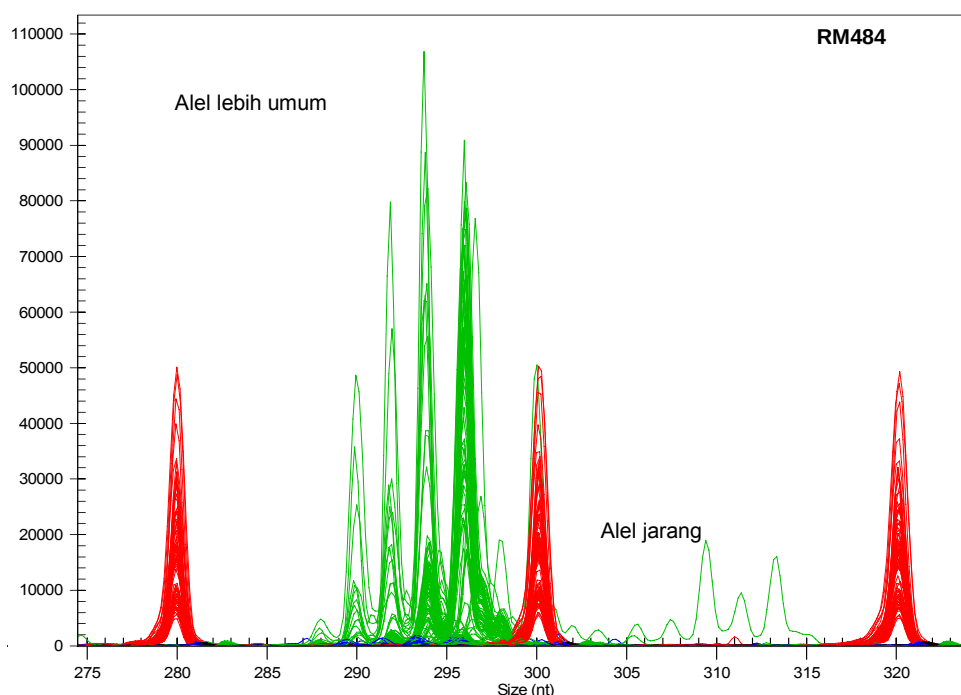
Gambar 2. Signal fluoresen yang dihasilkan dari 96 aksesori padi yang digabung dalam 1 grafik (*overlay graph*), dari 5 marka yang digunakan dalam Panel 5. Perbedaan ukuran pita DNA yang ditunjukkan oleh perbedaan ukuran puncak-puncak yang dihasilkan dalam satu marka, menunjukkan adanya polimorfisme di antara aksesori-aksesori yang digunakan.

yang spesifik untuk masing-masing kluster (Japonica, Indica, atau kerabat liar), kombinasi dari dua kluster, maupun seluruh kluster. Tingkat keragaman genetik yang dihasilkan dari penelitian ini setara dengan hasil penelitian Jain *et al.* (2004), yang melakukan analisis genetik untuk padi aromatik dan aksesori-aksesori padi berkualitas unggul di India. Dalam penelitiannya mereka menggunakan 30 SSR pada 69 genotipe padi. Jumlah alel per lokus yang diperoleh berkisar antara 3-22, dengan rerata 7,8. Nilai PIC yang diperoleh adalah 0,6 dengan kisaran antara 0,2-0,9.

Untuk keperluan aplikasi praktis, terdeteksinya alel-alel yang spesifik untuk kluster tertentu dapat membantu dalam hal menentukan marka-marka SSR mana yang dapat digunakan dalam suatu populasi hasil persilangan. Dari segi genetika evolusi, dimungkinkan untuk mendeteksi ada tidaknya keterkaitan suatu alel dari suatu kelompok dengan kelompok lainnya, dan dapat dimungkinkan untuk menelusuri keberadaan suatu alel pada plasma nutfah yang telah dibudidayaan dari kerabat liarnya.

Analisis Sidik Jari DNA Tanaman Ubi Jalar

Indonesia, khususnya Papua, telah lama dikenal sebagai salah satu wilayah yang memiliki keragaman plasma nutfah ubi jalar yang tinggi, di luar Amerika Latin (Mok dan Schmiediche 1999). Keragaman genetik yang tinggi merupakan modal utama dalam usaha pemuliaan tanaman untuk perbaikan varietas. Namun demikian, modal yang besar ini baru dapat dimanfaatkan secara maksimal untuk usaha perbaikan varietas setelah diperoleh informasi yang memadai tentang seberapa besar keragaman genetik dan pola hubungan kekerabatan antara aksesori yang satu dengan aksesori lainnya dalam plasma nutfah yang bersangkutan, baik secara fenotipik maupun genotipik atau molekuler. Di samping itu, kegiatan pemuliaan tanaman ubi jalar membutuhkan waktu yang relatif lebih panjang dan lebih rumit, dibandingkan dengan pemuliaan tanaman



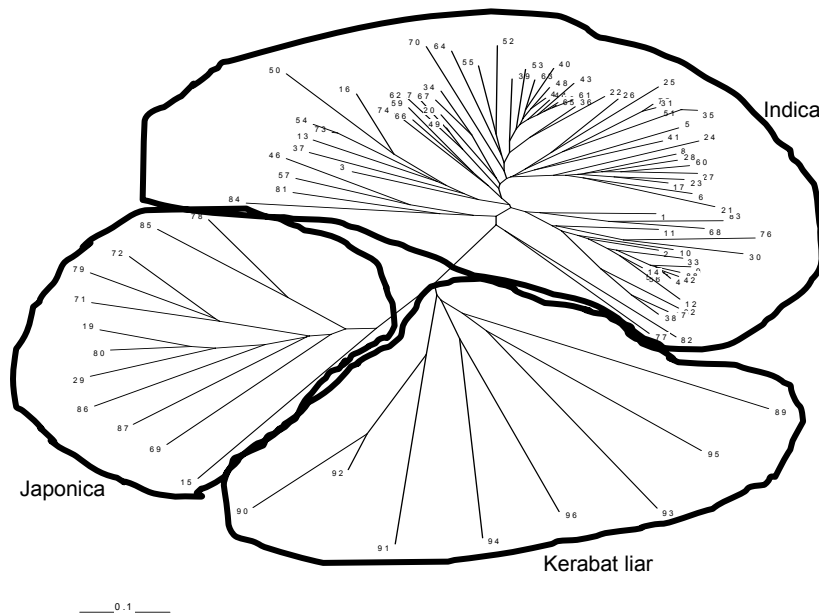
Gambar 3. Dengan marka SSR, contohnya RM484, alel yang umum maupun jarang terdapat dalam koleksi juga dapat terdeteksi.

musiman seperti misalnya padi atau jagung. Dengan demikian, karakterisasi fenotipik dan molekuler ini sangat diperlukan sebagai dasar perbaikan genetik secara lebih efisien dalam usaha pemuliaan tanaman ubi jalar, terutama untuk pemilihan tetua yang merupakan tahap utama yang akan sangat menentukan dalam keberhasilan pembuatan varietas baru, baik secara *polycross* maupun melalui hibridisasi intervarietal dan interspesifik.

Hasil PCR dari 96 aksesori ubi jalar dengan menggunakan 10 SSR di-*running* dalam 4 panel: 2 panel terdiri dari 3 marka (panel 1: IB286, IB316, ASUS P3; panel 2: IB318, IB248, IB255F1) dan 2 panel yang lain terdiri dari 2 marka (panel 3: ASUS P12, ASUS P16; panel 4: IB275, ASUS P7). Hasil analisis NTSYS menunjukkan bahwa semua aksesori yang diuji memiliki sidik jari DNA yang unik, kecuali tiga varietas unggul, yaitu Sewu, Boko, dan Kidal (Gambar 5.). Namun demikian, kesamaan genetik antara ketiganya kemungkinan besar hanya disebabkan oleh banyaknya data hilang dari alel-alel yang seharusnya diperoleh. Dari dendrogram yang dihasilkan, terlihat bahwa tidak ada keterkaitan antara aksesori dengan daerah asalnya, kecuali yang berasal dari Papua. Dendrogram juga menunjukkan bahwa kelompok plasma nutfah Wamena (W) mendominasi kluster yang berbeda dengan kelompok Manokwari (M). Hal ini dapat dimungkinkan oleh adanya kombinasi antara perbedaan material plasma nutfah pada waktu pertamakali introduksi (*founder groups*) dan isolasi geografis, yang mengakibatkan terjadinya peningkatan jarak genetik di antara kedua kelompok. Di samping mendominasi kedua kluster tersebut, sebagian plasma nutfah dari kedua daerah itu juga tersebar di kluster-kluster yang lain. Hal ini menunjukkan besarnya tingkat keragaman genetik dari plasma nutfah yang berasal dari daerah Papua. Hasil penelitian ini memberikan dukungan data secara molekuler bahwa Papua merupakan pusat sekunder keragaman genetik plasma nutfah ubi jalar dunia.

Analisis Sidik Jari DNA Tanaman Kedelai

Pada tanaman kedelai, standar yang biasanya digunakan untuk tujuan perlindungan varietas tanaman adalah pigmentasi dan beberapa sifat morfologi tambahan. Namun demikian, pada



Gambar 4. Dendrogram yang dihasilkan dari 96 aksesi padi dan 30 marka SSR dengan program PowerMarker. Aksesi terkelompok menjadi 3 kluster, yaitu kerabat liar, Japonica, dan Indica. Untuk kelompok Japonica, terdapat 1 aksesi *Temperate Japonica*, yaitu Nipponbare dan 11 aksesi *Tropical Japonica*.

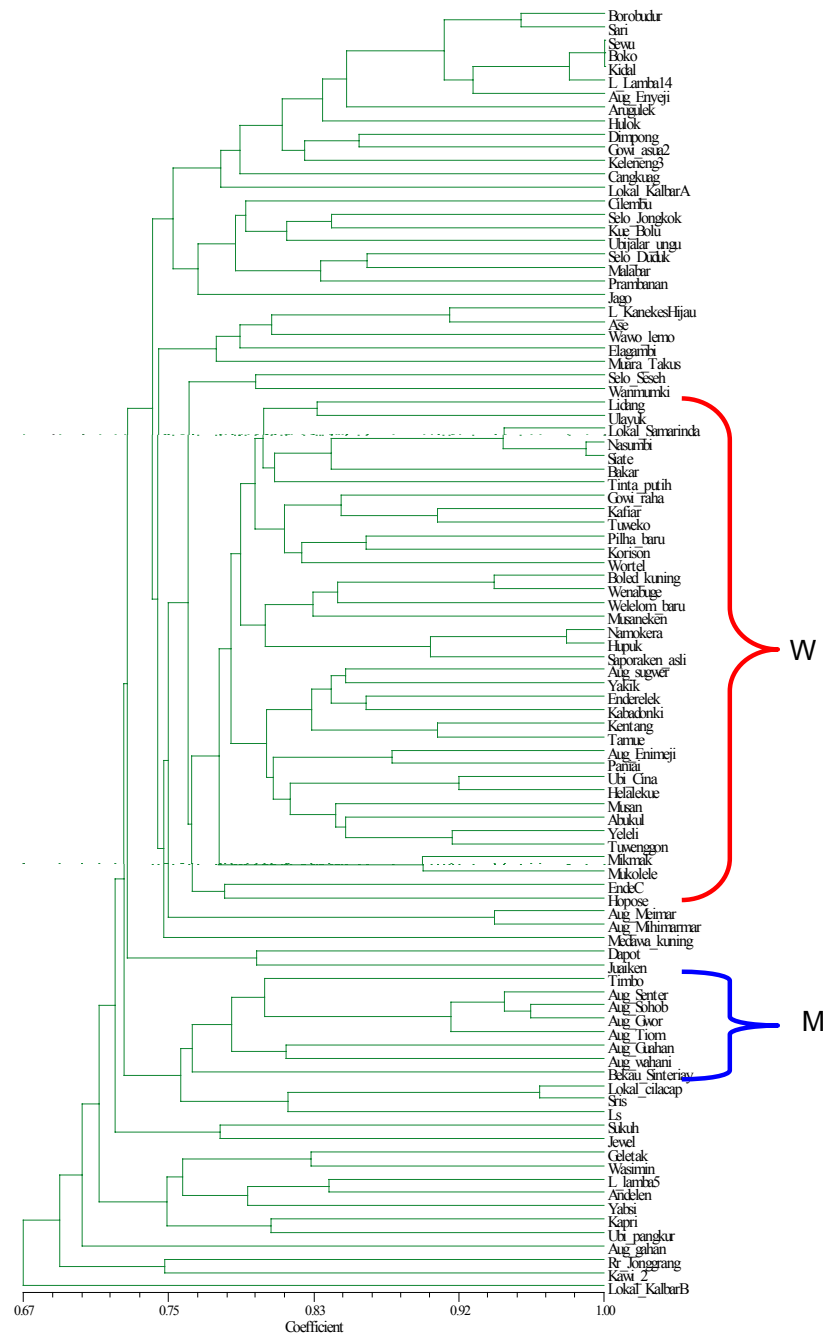
saat ini banyak kedelai komersial yang hanya dihasilkan dari galur-galur elit yang jumlahnya terbatas, sehingga sering varietas-varietas tersebut tidak dapat dibedakan satu sama lain hanya berdasarkan sifat-sifat tersebut (Diwan dan Cregan 1997). Dalam situasi seperti ini, peran identifikasi varietas dengan menggunakan marka molekuler akan sangat membantu.

Dalam penelitian tahun anggaran 2004 ini, sebagai penelitian pendahuluan atau rintisan untuk tanaman kedelai, hanya digunakan 10 marka SSR dan 96 aksesi kedelai. Untuk keperluan *multiplexing*, kesepuluh marka tersebut telah dibagi menjadi 3 panel, yaitu panel 1 terdiri 4 marka (SATT308, SATT038, SATT114, dan SATT242), panel 2 terdiri dari 4 marka (SATT147, SATT243, SATT414, dan SATT294), dan panel 3 terdiri dari 2 marka (SATT009 dan SATT177). Data 96 varietas yang telah di-*genotype* dengan menggunakan 10 marka SSR tersebut menunjukkan adanya beberapa grup atau kluster (Gambar 6). Sebanyak 116 alel teridentifikasi, berkisar antara 7-19 per lokus, jumlah terendah dideteksi oleh SATT114, sedangkan tertinggi oleh SATT 009. Adapun besarnya rerata nilai PIC adalah 0,7030.

Seperti telah diketahui, bahwa kultivar kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) merupakan hasil domestikasi dari kerabat liarnya, yaitu *Glycine soja* Sieb. & Zucc. di kawasan Asia Timur, terutama Jepang dan Cina (Xu *et al.* 2002). Namun demikian, dalam penelitian ini, karena tidak adanya aksesi yang dapat digunakan sebagai *outgroup* (aksesi liar) ataupun aksesi kontrol internasional (terutama dari kawasan Asia Timur), maka hubungan kekerabatan dari plasma nutfah yang digunakan dengan plasma nutfah yang berasal dari pusat diversitas genetik utama (kawasan Asia Timur), menjadi kurang jelas. Namun demikian, dapat dilihat kecenderungan bahwa varietas unggul yang digunakan cenderung mengelompok dalam kluster tertentu secara bersama-sama (salah satu contoh No. 76: Krakatau, 95: Kerinci, 93: Singgalang, dan 73: Tanggamus). Hal ini menunjukkan kedekatan hubungan kekerabatan di antara varietas unggul tersebut. Dengan demikian, dari hasil penelitian ini terlihat bahwa sebagian besar varietas unggul kedelai yang kita budidayakan pada saat ini, diperoleh dari koleksi plasma nutfah dengan tingkat keragaman yang relatif sempit. Keadaan ini dapat menyebabkan tanaman kedelai yang kita budidayakan menjadi rentan terhadap cekaman biotik maupun abiotik, yang pada akhirnya mengakibatkan berkurangnya hasil panen. Di masa mendatang, program pemuliaan tanaman kedelai dalam rangka menghasilkan varietas unggul perlu mempertimbangkan tingkat keragaman 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 marka SSR yang digunakan dapat terdeteksi perbedaan genetik di antara 2 aksesori yang mempunyai nama sama, dengan nomor aksesori yang berbeda (contoh sampel 15 dan 26), namun ada juga yang mempunyai nama berbeda tetapi mempunyai identitas genetik yang sama (contoh sampel 9 dan 10). Dalam penelitian ini, aksesori nomor 48, 67, dan 92, ketiganya mempunyai kesamaan genetik, karena dalam penyiapan benih, secara tidak sengaja, nomor aksesori yang sama terambil sebanyak 3 kali. Dengan demikian, marka yang digunakan dapat mendeteksi adanya heterogenitas dalam satu aksesori dan dapat pula mengidentifikasi adanya kemung-

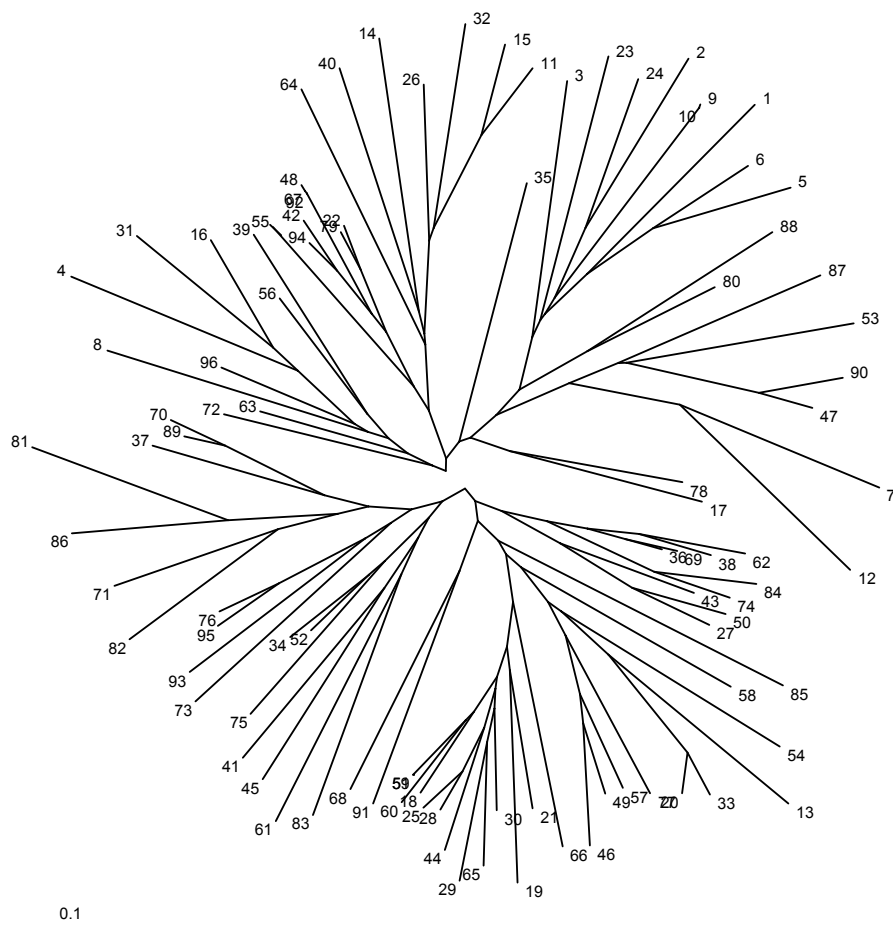


Gambar 5. Dendrogram yang dihasilkan oleh program NTSYS dari 96 aksesori ubi jalar dengan 10 marka SSR.

kinan duplikasi dalam koleksi. Informasi ini akan sangat bermanfaat dalam rangka perbaikan pengelolaan plasma nutfah agar menjadi lebih efektif dan efisien.

Dalam penelitian ini dapat dideteksi sebanyak 58 alel yang jarang ditemukan. Alel yang jarang ditemukan ini, dapat berpotensi besar apabila berkaitan dengan gen-gen penting yang bermanfaat. Di samping itu, ada juga kecenderungan bahwa alel-alel tersebut kemungkinan merupakan koleksi dari plasma nutfah yang masih *under representative*.

Walaupun hanya dengan menggunakan 10 marka SSR saja keragaman genetik yang cukup tinggi dapat diperoleh dan sebagian besar plasma nutfah sudah dapat dibedakan satu sama lain, jumlah ini sebetulnya belum mencukupi. Agar tingkat diskriminatif atau kemampuan untuk membedakan aksesori yang satu dengan aksesori yang lain menjadi lebih tinggi, paling tidak diperlukan 20 SSR yang mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi. Salah satu contohnya, dengan materi 35 aksesori kedelai yang diobservasi dengan 20 SSR, Diwan dan Cregan (1997) berhasil membedakan kultivar-kultivar modern yang secara morfologis, baik pigmentasi maupun sifat-sifat morfologi lainnya, tidak dapat dibedakan satu sama lain. 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 varietas kedelai pada tahun mendatang menjadi lebih tinggi, penelitian lanjutan dengan penambahan jumlah SSR dan aksesori sangat diperlukan. Di samping itu, perlu ditambahkan beberapa aksesori liar sebagai *outgroup* dan aksesori kontrol, sehingga selain diperoleh sidik jari DNA yang diperlukan untuk keperluan identifikasi varietas, juga diperoleh data klasterisasi yang jelas untuk studi keragaman genetik.



Gambar 6. Dendrogram yang dihasilkan oleh program PowerMarker dari 96 aksesori kedelai dan 10 marka SSR.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, R., V. Shenoy, J. Ramadevi, R. Rajkumar, and L. Sing. 2002.** Molecular characterization of some Indian Basmati and other elite rice genotypes using fluorescent-AFLP. *Theor. Appl. Genet.* 105:680-690.
- 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. Ganai, 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 fluorescent-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.
- Jain, S., R.K. Jain, and S.R. McCouch. 2004.** Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:965-977.
- Mok, I.G. and P. Schmidiche. 1999.** Collecting, characterizing, and maintaining sweetpotato germplasm in Indonesia. *Plant Genetic Resources Newsletter* 118:12-18.
- Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E.A. Siddiq, and S.E. Hasnain. 2002.** Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties using FISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5836-5841.
- Ni, J., P.M. Colowit, and D.J. Mackill. 2002.** Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellites markers. *Crop Sci.* 42:601.
- 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.
- Thomson, 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. *In* Doré, Dosba and Baril. (Eds.) *Proc. Int. Symp. on Molecular Markers. 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.
- Zhang, D.P., D. Carbajulca, L. Ojeda, G. Rossel, S. Milla, C. Herrera, and M. Ghislain. 2000.** Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America. CIP Program Report 1999-2000. p. 295-301.