P-ISSN: 2356-1297 E-ISSN : 2528-7222

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

KERAGAMAN GENETIK KLON KAKAO LOKAL SULAWESI TENGGARA BERDASARKAN MARKA SSR DAN KARAKTER MORFOLOGI

GENETIC DIVERSITY OF CACAO CLONES FROM SOUTHEAST SULAWESI BASED ON SSR MARKERS AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS

* Nur Kholilatul Izzah[1)], Budi Martono[1)], Baharuddin,[2)] dan Edi Wardiana[1)]

[1)] Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
* *lila_ref@yahoo.co.id*
[2)] Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Sulawesi Tenggara
Jl. Profesor Muhammad Yamin No. 89, Lasoso, Sampara, Puuwatu, Kendari 93354 Indonesia

(Tanggal diterima: 12 Mei 2018, direvisi: 14 Mei 2018, disetujui terbit: 12 November 2018)

ABSTRAK

Karakterisasi molekuler dan morfologi pada klon kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara sangat penting dilakukan untuk mengetahui keunggulan dan hubungan kekerabatan dari masing-masing klon. Analisis keragaman genetik menggunakan marka molekuler juga bermanfaat untuk mendeteksi adanya duplikasi di antara klon yang dikoleksi. Tujuan penelitian adalah mengetahui keragaman genetik klon kakao lokal Sulawesi Tenggara berdasarkan marka SSR dan karakter morfologi. Penelitian dilaksanakan di *Sub Station* Penelitian Kakao, Desa Lebojaya, Kecamatan Konda, Kabupaten Konawe Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Laboratorium Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar Sukabumi, serta Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Bogor, mulai bulan April sampai November 2015. Analisis keragaman genetik dilakukan pada 21 klon kakao yang meliputi 19 klon lokal dan 2 varietas nasional sebagai pembanding dengan menggunakan 22 marka SSR. Hasil karakterisasi molekuler diperoleh 11 marka bersifat polimorfik, selanjutnya digunakan untuk mengelompokkan klon kakao menggunakan program NTSYS. Hasil pengelompokan membagi klon kakao menjadi 4 kelompok utama pada nilai kesamaan genetik 0,46. Berdasarkan nilai jarak genetik >0,70 diperoleh 8 kombinasi klon kakao yang dapat dipilih sebagai tetua persilangan dengan harapan untuk meningkatkan efek heterosis pada keturunannya. Hasil karakterisasi morfologi secara umum menunjukkan adanya keragaman antar keempat kelompok kakao yang terbentuk. Berdasarkan karakter molekuler dan morfologi dapat diketahui bahwa klon kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara mempunyai keragaman yang tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam program pengembangan varietas unggul baru.

Kata kunci: Kakao, karakter morfologi, keragaman genetik, marka SSR

ABSTRACT

Molecular and morphological characterization of cacao clones obtained from exploration in Southeast Sulawesi is very important to know their superiority and genetic relationships. Analysis of genetic diversity using molecular markers is also useful for detecting duplication found among collected clones. The research aimed to determine the genetic diversity of local cacao clones derived from Southeast Sulawesi based on SSR markers and morphological characters. The research was conducted at Cacao Research Sub-Station, Lebojaya Village, Konda Subdistrict, South Konawe Regency, Southeast Sulawesi, and Integrated Laboratory of Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute Sukabumi, and Molecular Biology Laboratory of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development Bogor, from April to November 2015. Genetic diversity analysis was performed on 21 cacao clones covering 19 local clones and 2 national varieties using 22 SSR markers. The

molecular characterization results showed that 11 markers are polymorphic, and subsequently used to group cacao clones using NTSYS program. The grouping results divided the cacao clones into 4 main groups at 0.46 genetic similarity values. Based on genetic distance values >0.7, 8 combinations of cacao clones can be selected as parental clones with the expectation to increase the effect of heterosis on progeny. On the other hand, result of morphological characterization generally indicated the diversity between the four cacao groups. Based on molecular and morphological characterization, it can be seen that cacao clones derived from Southeast Sulawesi have a high diversity and can be utilized in the development program of new improved varieties.

Keywords: *Cacao, genetic diversity, morphological character, SSR markers*

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman tropis yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan menjadi komoditas andalan bagi sebagian besar petani di Indonesia. Salah satu wilayah yang dikenal sebagai penghasil kakao di Indonesia adalah Provinsi Sulawesi Tenggara dengan produksi 101.835 ton dari total produksi nasional sebesar 659.776 ton pada tahun 2017 (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2017). Potensi lain yang dimiliki oleh Sulawesi Tenggara adalah ditemukannya beragam jenis klon-klon kakao unggul lokal yang dapat digunakan sebagai materi genetik dalam pengembangan varietas unggul baru (Rubiyo, Izzah, Sulistiyorini, & Tresniawati, 2015). Keragaman genetik yang luas merupakan landasan penting untuk perbaikan tanaman dan komponen utama dari strategi konservasi dan pemuliaan yang efektif (Thomson *et al.*, 2007).

Kakao dikenal sebagai tanaman yang mempunyai variasi tinggi pada penampilan fenotipik, contohnya warna buah yang belum matang, ketebalan kulit buah, jumlah biji, serta ukuran biji dan buah (Martínez, de la Cruz, Nelson, & Bertin, 2015). Selain itu, Efombagn, Sounigo, Nyassé, Manzanares-Dauleux, & Eskes (2009) juga mengemukakan bahwa penampilan fenotipik buah kakao berperan penting dalam menentukan jenis dan populasi kakao. Keragaman sifat morfologi pada kakao tersebut menjadi dasar dalam pengelompokan tanaman kakao yang dibudidayakan menjadi tiga tipe berbeda, yaitu Criollo, Forastero, dan Trinitario (Lanaud *et al.*, 1999; Yang *et al.,* 2013). Berdasarkan analisis molekuler menggunakan 106 marka *simple sequence repeats* (SSR), Motamayor *et al.* (2008) menyusun klasifikasi baru tanaman kakao menjadi 10 grup, yaitu Criollo, Amelonado, Nacional, Maranon, Nanay, Purus, Contamana, Iquitos, Guiana, dan Curaray. Sementara itu, hasil penelitian Cosme, Cuevas, Zhang, Oleksyk, & Irish (2016) menggunakan marka *expressed sequence tag-derived single nucleotide polymorphism* (EST-SNP) membagi kakao menjadi 5 kelompok genetik berbeda, yaitu Criollo, Trinitario, Amelonado, Upper Amazon Forastero (UAF), dan Nacional. Beragamnya morfologi tanaman kakao tersebut diduga merupakan hasil rekombinasi, mutasi kumulatif, dan seleksi pada individu yang dipengaruhi oleh lingkungan, serta dapat menjadi sumber daya genetik potensial bagi program pemuliaan tanaman (Jing *et al.*, 2010; Rubiyo *et al.,* 2015).

Salah satu upaya untuk meningkatkan keragaman genetik pada koleksi plasma nutfah kakao adalah dengan melakukan eksplorasi. Eksplorasi merupakan kegiatan mencari, menemukan, dan mengumpulkan sumber daya genetik (SDG) tertentu yang dilakukan secara sengaja pada daerah-daerah sentra produksi, produksi tradisional, terisolir, maupun pertanian lereng-lereng gunung (Nurbani, 2015). Sementara itu, Sujiprihati & Syukur (2012) menyatakan bahwa koleksi SDG merupakan suatu upaya yang dilakukan untuk menghindari lenyapnya jenis-jenis yang ada pada pusat penyebaran dan sentra produksi tanaman tersebut. Pada penelitian ini, eksplorasi plasma nutfah kakao dilakukan di Provinsi Sulawesi Tenggara yang dikenal sebagai salah satu sentra produksi kakao nasional. Plasma nutfah kakao hasil eksplorasi tersebut selanjutnya perlu dikarakterisasi sifat-sifatnya untuk mengetahui ciri serta keunggulan dari masing-masing individu tanaman.

Karakterisasi tanaman, baik secara morfologi maupun molekuler, merupakan pendekatan yang harus ditempuh sebelum memanfaatkan koleksi plasma nutfah. Karakterisasi morfologi tanaman dengan sifat yang diinginkan merupakan langkah penting untuk pemanfaatan plasma nutfah yang efektif (Santos, Pires, & Correa, 2012). Sifat morfologi tanaman budi daya sangat bermanfaat untuk deskripsi, identifikasi, karakterisasi, dan evaluasi tanaman hasil seleksi. Selain itu, karakterisasi morfologi juga sangat bermanfaat untuk mengetahui ciri-ciri dari karakter vegetatif dan generatif dari masing-masing koleksi plasma nutfah (Martínez *et al.,* 2017). Namun demikian, karakterisasi secara morfologi mempunyai keterbatasan, yaitu kesalahan identifikasi karena salah pelabelan, dipengaruhi oleh faktor lingkungan, serta memerlukan banyak waktu dan biaya untuk mengamati tanaman dalam jumlah yang besar (Motamayor *et al.,* 2008). Oleh karena itu, perlu dibantu dengan karakterisasi secara molekuler dalam mengidentifikasi tanaman. Penggunaan marka molekuler diketahui lebih efektif dan meyakinkan dalam membedakan individu tanaman karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Reflinur, Lestari, & Lee, 2016). Marka SSR merupakan salah satu jenis marka yang banyak

digunakan untuk menganalisis variasi genetik tanaman. Keunggulan marka SSR adalah mempunyai lokus spesifik, pewarisan secara ko-dominan, produktivitas tinggi, dan proses deteksi berbasis *polymerase chain reaction* (PCR) (Varshney, Graner, & Sorrells, 2005).

Hasil penelitian sebelumnya telah membuktikan keefektifan 14 marka SSR polimorfik dalam mengelompokkan kakao hasil eksplorasi di daerah Kolaka, Sulawesi Tenggara menjadi 3 kelompok berbeda pada nilai kesamaan genetik 36% (Rubiyo *et al.*, 2015). Demikian juga hasil penelitian Tresniawati, Izzah, Sulistiyorini, & Wicaksono (2017) yang berhasil mengelompokkan 11 klon kakao lokal hasil eksplorasi di Kabupaten Lima Puluh Kota, Sumatera Barat berdasarkan 12 marka SSR polimorfik pada nilai kesamaan genetik 68%. Karakterisasi secara molekuler sebaiknya juga digunakan dalam mengidentifikasi tanaman untuk mendukung hasil karakterisasi secara morfologi. Analisis gabungan data molekuler dan morfologi dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif untuk mendukung upaya pemuliaan konvensional (Martínez *et al.*, 2017). Penelitian bertujuan menganalisis keragaman genetik klon kakao lokal Sulawesi Tenggara berdasarkan marka SSR dan karakter morfologi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di *Sub Station* Penelitian Kakao, Desa Lebojaya, Kecamatan Konda, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara dan Laboratorium Molekuler lingkup Laboratorium Terpadu, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri) Sukabumi, serta Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor, mulai bulan April sampai November 2015.

Materi Tanaman

Materi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 19 klon kakao lokal hasil eksplorasi dari kebun petani di hampir seluruh kabupaten di wilayah Sulawesi Tenggara dan 2 varietas nasional, yaitu MCC 01 dan MCC 02 sebagai pembanding. Kedua varietas nasional tersebut dipilih sebagai pembanding karena mempunyai beberapa keunggulan, yaitu mempunyai potensi produksi tinggi, ukuran biji relatif besar, kadar lemak tinggi, serta tahan terhadap penyakit busuk buah kakao (BBK) dan *vascular streak dieback* (VSD). Sementara itu, klon kakao lokal yang diuji keragaman genetiknya pada penelitian ini berbeda dengan klon kakao yang digunakan oleh Rubiyo *et al.* (2015). Klon kakao lokal tersebut diseleksi berdasarkan beberapa kriteria, antara lain mempunyai ukuran buah besar, jumlah buah banyak, ukuran biji besar, tahan terhadap penyakit VSD dan hama penggerek buah kakao (PBK). Semua klon kakao lokal tersebut merupakan koleksi *Sub Station* Penelitian Kakao, Dinas Perkebunan dan Hortikultura, Provinsi Sulawesi Tenggara.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan 3 g daun kakao yang masih muda dan sehat. Daun kakao tersebut dipotong kecil-kecil kemudian digerus menggunakan mortar dan pestle dengan menambahkan nitrogen cair sampai menjadi serbuk halus. Proses ekstraksi DNA genomik kakao dilakukan berdasarkan metode *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (Allen, Flores-Vergara, Krasynanski, Kumar, & Thompson, 2006). DNA hasil ekstraksi selanjutnya diukur kualitas dan kuantitasnya menggunakan alat NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Hasil pengukuran konsentrasi DNA menggunakan alat NanoDrop ND-100 tersebut digunakan sebagai dasar untuk mengencerkan DNA menjadi konsentrasi 10 ng/µl dengan menggunakan larutan 1x bufer TE untuk keperluan analisis PCR.

Proses Amplifikasi PCR

Reaksi PCR dilakukan menggunakan total volume 15 µl dengan komposisi bahan kimia terdiri dari 10 ng DNA, 0,2 µM primer *forward* dan *reverse*, serta 1x *PCR mix* (KAPA2G *Fast ReadyMix*). Tipe marka DNA yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA kakao adalah marka SSR sebanyak 22 pasang (Tabel 1) yang sebelumnya telah didesain oleh Lanaud *et al*. (1999) dan Pugh *et al.* (2004). Proses amplifikasi DNA dengan program PCR dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu: (1) pre-denaturasi (95˚C; 3 menit); (2) denaturasi (95˚C; 15 detik), penempelan primer (*annealing*) (49˚C–54˚C; 15 detik), dan perpanjangan (*extension*) (72˚C; 15 detik), semua proses dalam tahap ini diulang sebanyak 35 siklus; dan (3) perpanjangan akhir (*final extension*) (72˚C; 10 menit). Produk PCR yang dihasilkan kemudian diseparasi menggunakan gel agarose 1% yang mengandung pewarna *GelRed* (biotium) pada larutan 0,5x bufer TBE. Selanjutnya, gel hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *UV transluminator*. Proses selanjutnya adalah separasi DNA kakao yang telah teramplifikasi sempurna menggunakan gel poliakrilamid non-denaturasi 6% pada larutan 1x bufer TBE untuk menentukan polimorfisme. Gel hasil elektroforesis tersebut kemudian diwarnai menggunakan larutan *ethidium bromide* selama 20 menit dan divisualisasi pada *UV transluminator* menggunakan *gel documentation system*.

Tabel 1. Marka SSR yang digunakan untuk mengamplifikasi 19 klon kakao lokal Sulawesi Tenggara dan 2 varietas nasional
Table 1. SSR markers used to amplify 19 local cacao clones from Southeast Sulawesi and 2 national varieties

Marka SSR	Urutan basa primer *forward*	Urutan basa primer *reverse*	Motif pengulangan	Lokasi kromosom	Ukuran alel referensi (bp)
mTcCIR1	GCAGGGCAGGCTCAGTGAAGCA	TGGGCAACCAGAAAACGAT	$(CT)_{14}$	8	128–146
mTcCIR15	CAGCCGCCTCTTGTTAG	TATTTGGGATTCTTGATG	$(TC)_{19}$	1	254
mTcCIR24	TTTGGGGTGATTTCTTCTGA	TCTGTCTCGTCTTTTGGTGA	$(AG)_{13}$	9	186–207
mTcCIR33	TGGGTTGAAGATTTGGT	CAACAATGAAAATAGGCA	(TG)11	4	265–348
mTcCIR287	TCCTTTCTGTTTGTTCCT	TTATCCGTGTCTCCTTCT	$(TC)_{9}$	9	301
mTcCIR90	CCACTTCAAAAACCATTCTA	GCAACTGTCAACCATTATCTA	$(CT)_{10}$	9	291
mTcCIR145	CAGACTTCCAACTCAAAACT	TGAGAATAGATGGACCGAT	$(CT)_{17}$	9	117
mTcCIR167	GTAGAACCATAAACAACATT	ACAATCATTAAAAATACGAG	$(GA)_{16}$	3	254
mTcCIR229	ATCTCGGTAATAGCACATAA	CGCAATCCTACAACACA	$(TC)_{8}$	10	307
mTcCIR264	TGCTATCCACAACCAGT	TAACTCACTTTTGCCACTA	$(CT)_{8}$	1	192
mTcCIR276	TCCTGCTTTTTAATACAT	GTCCTATCTGCCTCACT	$(GA)_{14}$	6	124
mTcCIR91	TTTTGCTGAGTGTTGCTGT	ATCCGAGAAATAGAATAGGTTA	$(CT)_{10}$	10	186
mTcCIR18	GATAGCTAAGGGGATTGAGGA	GGTAATTCAATCATTTGAGGATA	$(GA)_{12}$	4	345
mTcCIR7	ATGCGAATGACAACTGGT	GCTTTCAGTCCTTTGCTT	$(GA)_{11}$	7	160
mTcCIR10	ACAGATGGCCTACACACT	CAAGCAAGCCTCATACTC	$(TG)_{13}$	-	208
mTcCIR40	AATCCGACAGTCTTTAATC	CCTAGGCCAGAGAATTGA	$(AC)_{15}$	3	262–288
mTcCIR141	TGTTGCATAAAACACGAGTTC	CCTAAAATCCTTCCTAACAGC	$(TC)_{14}$	7	217
mTcCIR81	TGAAACTCCCATACTACTGA	ACAATCTGTCCATTATTCTG	$(CT)_{15}$	3	216
mTcCIR198	TGGGACCATAAGGAAATC	CCCAGGTGAAGTAAGACA	$(CA)_{3}TA(CA)_{6}$	3	186
mTcCIR138	CTGCCAAGTCAAGTAAGTTC	CTGTGGTATCAATCAATCTAAT	$(CA)_{11}$	1	128
mTcCIR268	TGTAATCCAAATAATAAGCAT	CAGTGAAGAGGCAAGAGA	$(GA)_{17}GG(GA)_{9}$	2	316
mTcCIR281	CCGCTGTTTTGGTATTTC	GGATGAGGGGTGGTTG	$(TC)_{12}(CA)_{14}$	2	194

Karakterisasi Morfologi

Pengamatan karakter morfologi dilakukan di kebun *Sub Station* Penelitian Kakao, Desa Lebojaya, Kecamatan Konda, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara. Pengamatan dilakukan pada tanaman kakao yang telah berumur 5 tahun setelah grafting. Jumlah tanaman kakao yang diamati sebanyak 10 pohon untuk setiap klon yang dipilih secara acak sederhana. Parameter yang diamati meliputi lebar tajuk (utara-selatan dan barat-timur), tinggi pohon, lingkar batang, panjang dan lebar daun, panjang tangkai daun, jumlah buah/pohon, panjang, lingkar, dan bobot buah, serta panjang, lebar, dan tebal biji.

Analisis Data

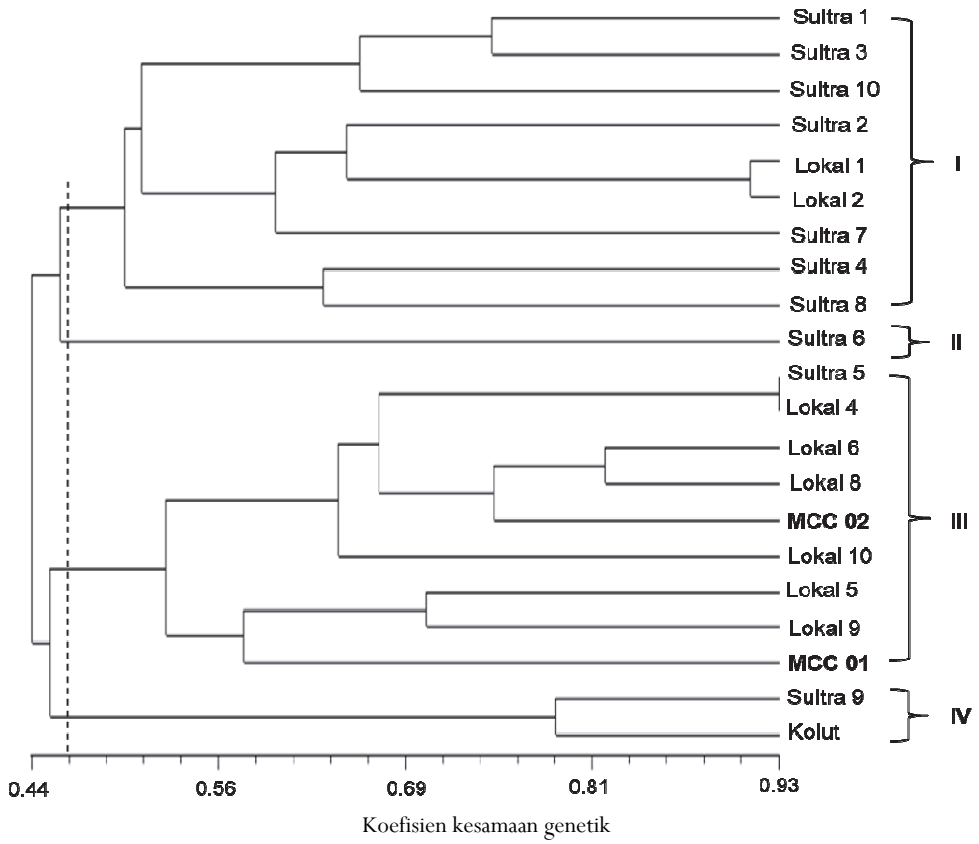
Hasil amplifikasi DNA yang menunjukkan pita polimorfik diberi skor menggunakan format data biner, yaitu skor 1 apabila terdapat pita dan 0 apabila tidak ada pita. Data biner tersebut selanjutnya digunakan untuk melakukan analisis keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar klon kakao lokal berdasarkan metode *unweighted pair group with arithmetic mean* (UPGMA) yang terdapat pada program NTSYS-PC versi 2.1 (Rohlf, 2000). Kesamaan genetik antara klon kakao dihitung berdasarkan koefisien *simple matching* (SM) dengan menggunakan subprogram SIMQUAL. Analisis klaster dilakukan dengan menggunakan metode UPGMA pada subprogram SAHN NTSYS-PC. Sementara itu, nilai jarak genetik antar klon kakao dihitung berdasarkan rumus 1-matrik kesamaan genetik.

Hasil pengelompokan klon kakao berdasarkan marka SSR selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk melakukan analisis keragaman klon kakao berdasarkan karakter morfologi. Data karakter morfologi dianalisis berdasarkan empat kelompok genetik menggunakan analisis ragam satu arah (*one-way anova*), dan apabila hasilnya nyata maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata perlakuan dengan menggunakan metode Tukey pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Genetik antar Klon Kakao Berdasarkan Marka SSR

Karakterisasi secara molekuler menggunakan 22 marka SSR pada 21 klon kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara menunjukkan bahwa 11 marka menghasilkan pita polimorfik, sedangkan 11 marka yang lain memperlihatkan pita monomorfik dan tidak spesifik. Nilai kesamaan genetik 0,46 digunakan sebagai ambang untuk mengelompokkan 21 klon kakao menjadi empat kelompok utama (Gambar 1). Kelompok I terdiri dari 9 klon lokal, yaitu Sultra 1, Sultra 3, Sultra 10, Sultra 2, Lokal 1, Lokal 2, Sultra 7, Sultra 4, dan Sultra 8, sedangkan kelompok II hanya terdiri dari satu klon, yaitu Sultra 6. Kelompok III terdiri dari 7 klon lokal (Sultra 5, Lokal 4, Lokal 6, Lokal 8, Lokal 10, Lokal 5, dan Lokal 9) dan 2 varietas nasional (MCC 01 dan MCC 02). Kelompok IV terdiri dari 2 klon lokal, yaitu Sultra 9 dan Kolut.



Gambar 1. Hasil pengelompokan 21 klon kakao berdasarkan marka SSR. Klon kakao dengan cetak normal merupakan klon lokal hasil eksplorasi dari Sulawesi Tenggara, sedangkan klon dengan cetak tebal adalah varietas nasional

Figure 1. Clustering of 21 cacao clones based on SSR markers. Cacao clones with normal letters are local clones derived from Southeast Sulawesi, whereas clones with bold letters are national varieties

Pengelompokan genetik berdasarkan marka SSR menunjukkan bahwa semua klon kakao hasil eksplorasi di Sulawesi Tenggara mempunyai variasi genetik 0,07–0,56 atau mempunyai kesamaan genetik 0,44–0,93 (Gambar 1). Nilai variasi genetik antar klon kakao yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan nilai variasi genetik klon kakao yang berasal dari Kolaka, Sulawesi Tenggara, yaitu 0,12–0,73 (Rubiyo *et al.*, 2015). Hal ini diduga disebabkan oleh jenis klon kakao yang berbeda serta perbedaan jumlah marka SSR yang digunakan. Namun demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa semua klon kakao tersebut mempunyai keragaman genetik tinggi yang diperlukan dalam upaya pengembangan varietas unggul baru. Kondisi ini sesuai dengan pernyataan Wicaksono, Rubiyo, Sukma, & Sudarsono (2017) bahwa ketersediaan klon unggul lokal dapat meningkatkan peluang keberhasilan dalam merakit varietas unggul baru. Hasil dendrogram juga memperlihatkan bahwa 2 varietas nasional yang digunakan sebagai pembanding pada penelitian ini (MCC 01 dan MCC 02) terletak pada kelompok III, menandakan adanya hubungan kekerabatan yang dekat dengan klon lokal yang terdapat pada kelompok yang sama.

Di sisi lain, marka SSR yang digunakan terbukti cukup efektif dalam membedakan semua klon kakao lokal hasil eksplorasi, kecuali antara klon Sultra 5 dengan Lokal 4 yang mempunyai kemiripan genetik 0,93 (jarak genetik 0,07). Demikian juga antara klon Lokal 2 dengan Lokal 1 yang mempunyai nilai kesamaan genetik 0,91 (jarak genetik 0,09) (Tabel 2). Diduga pasangan klon-klon kakao tersebut sebenarnya adalah klon yang sama secara genetik, namun dikoleksi dengan nama yang berbeda. Kejadian yang sama juga dilaporkan oleh Rubiyo *et al.* (2015) pada saat mengidentifikasi klon kakao lokal hasil observasi di daerah Kolaka. Selain itu, hasil penelitian Izzah *et al.* (2013) pada tanaman kubis juga berhasil mendeteksi dua varietas, yaitu Charmant dan GC 60 yang mempunyai kesamaan genetik 1 meskipun dikenal dengan nama yang berbeda.

Tabel 2. Nilai jarak genetik antar klon kakao lokal Sulawesi Tenggara yang dianalisis berdasarkan marka SSR
Table 2. Genetic distance values among local cacao clones derived from Southeast Sulawesi analyzed based on SSR markers

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. S1	0,00																				
2. S2	0,43	0,00																			
3. S3	0,26	0,47	0,00																		
4. S4	0,39	0,49	0,53	0,00																	
5. S5	0,49	0,53	0,51	0,63	0,00																
6. S6	0,54	0,53	0,51	0,54	0,48	0,00															
7. S7	0,50	0,43	0,53	0,59	0,44	0,49	0,00														
8. S8	0,59	0,52	0,44	0,37	0,56	0,51	0,53	0,00													
9. S9	0,57	0,50	0,52	0,62	0,64	**0,75**	0,50	0,48	0,00												
10. S10	0,35	0,53	0,33	0,54	0,53	0,53	0,54	0,45	0,65	0,00											
11. L1	0,45	0,31	0,43	0,51	0,50	0,61	0,35	0,43	0,64	0,44	0,00										
12. L2	0,53	0,39	0,50	0,58	0,56	0,62	0,42	0,50	0,65	0,52	0,09	0,00									
13. L4	0,53	0,57	0,50	**0,71**	0,07	0,51	0,48	0,60	0,63	0,51	0,49	0,50	0,00								
14. L5	0,61	0,60	0,58	0,55	0,40	0,59	0,35	0,58	0,60	0,60	0,41	0,42	0,38	0,00							
15. L6	0,54	0,53	0,56	0,63	0,22	0,57	0,40	0,64	0,69	0,58	0,45	0,51	0,29	0,35	0,00						
16. L8	0,61	0,50	0,65	0,51	0,32	0,55	0,32	0,59	0,56	0,67	0,63	0,69	0,40	0,46	0,18	0,00					
17. L9	0,61	0,60	**0,74**	0,65	0,44	0,59	0,50	**0,74**	0,65	0,60	0,62	0,63	0,43	0,30	0,44	0,56	0,00				
18. L10	0,67	0,60	0,58	0,70	0,35	0,69	0,45	0,53	0,60	0,60	0,51	0,58	0,38	0,50	0,40	0,32	0,65	0,00			
19. Kolut	0,58	0,46	0,57	0,64	0,45	**0,72**	0,50	0,57	0,21	0,69	0,61	0,62	0,48	0,59	0,45	0,30	**0,73**	0,45	0,00		
20. MCC01	0,53	0,58	0,44	0,63	0,46	0,57	0,47	0,44	0,50	0,45	0,37	0,39	0,45	0,42	0,41	0,59	0,53	0,53	0,57	0,00	
21. MCC02	0,49	0,52	0,57	0,67	0,39	**0,71**	0,35	**0,76**	0,57	0,58	0,55	0,61	0,38	0,49	0,26	0,25	0,40	0,35	0,42	0,56	0,00

Keterangan: Angka yang dicetak tebal menunjukkan nilai jarak genetik >0,70
Notes : Numbers in bold type indicates the value of genetic distance >0,70

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa karakterisasi secara molekuler dengan marka SSR sangat penting dilakukan dalam proses identifikasi tanaman, karena dapat mengetahui hubungan kekerabatan antar klon dan mendeteksi adanya duplikasi pada klon kakao hasil eksplorasi. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Motamayor *et al.* (2008) yang menggunakan 106 marka SSR untuk mengkarakterisasi 1.241 aksesi kakao dalam upaya menghindari kesalahan identifikasi dan kesalahan interpretasi analisis keragaman plasma nutfah kakao di Amerika Selatan. Memahami keragaman genetik yang terdapat dalam koleksi plasma nutfah merupakan syarat utama untuk mengadopsi strategi konservasi dan pengelolaan yang efektif untuk memanfaatkan sumber daya genetik dalam perbaikan genetik tanaman (Roorkiwal *et al.*, 2014).

Hubungan kekerabatan antar klon kakao lokal dapat diketahui melalui nilai jarak genetik antar klon yang dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai jarak genetik antar klon yang tinggi menunjukkan bahwa kedua klon tersebut mempunyai hubungan kekerabatan yang jauh, demikian juga sebaliknya. Dari Tabel 2 diketahui bahwa nilai jarak genetik antar klon bervariasi mulai 0,07–0,76. Nilai jarak genetik terendah (0,07) ditunjukkan pada kombinasi antara klon Lokal 4 dan Sultra 5, sedangkan nilai jarak genetik tertinggi (0,76) antara klon Sultra 8 dan MCC 02. Nilai jarak genetik ini dapat digunakan sebagai acuan dalam pemilihan tetua persilangan. Klon-klon yang mempunyai nilai jarak genetik tinggi (>0,50) dapat dipilih sebagai kombinasi tetua persilangan ideal dengan harapan untuk mendapatkan progeni yang lebih unggul dibandingkan kedua tetuanya (Rubiyo *et al.*, 2015; Dani, Izzah, & Randriani, 2016). Hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rubiyo *et al.* (2015) mendapatkan nilai jarak genetik tertinggi 0,88 yang ditunjukkan oleh kombinasi klon ICCRI 04 dan ICCRI 03. Sementara itu, pada penelitian ini diperoleh 8 kombinasi klon lokal dengan nilai jarak genetik >0,70 yang dapat digunakan sebagai tetua persilangan, antara lain Lokal 9 x Sultra 3 (jarak genetik 0,74), Lokal 4 x Sultra 4 (jarak genetik 0,71), Sultra 9 x Sultra 6 (jarak genetik 0,75), Kolut x Sultra 6 (jarak genetik 0,72), MCC 02 x Sultra 6 (jarak genetik 0,71), Lokal 9 x Sultra 8 (jarak genetik 0,74), MCC 02 x Sultra 8 (jarak genetik 0,76), dan Kolut x Lokal 9 (jarak genetik 0,73) (Tabel 2).

Nilai jarak genetik juga dikalkulasi antar kelompok klon kakao yang dianalisis berdasarkan metode UPGMA. Rata-rata nilai jarak genetik yang diperoleh antar kelompok yang terbentuk disajikan pada Tabel 3. Nilai jarak genetik antar kelompok II dan IV merupakan yang paling tinggi, yaitu 0,74, dibandingkan dengan antar kelompok yang lainnya, yaitu antara 0,51 sampai 0,59. Hal ini juga didukung dengan hasil dendrogram yang menunjukkan bahwa kelompok II dan IV masing-masing terdiri dari satu dan dua klon kakao, menandakan bahwa ketiga klon tersebut sangat berbeda secara genetik dengan klon kakao lainnya hasil eksplorasi di Sulawesi Tenggara. Oleh karena itu, persilangan antar klon kakao yang berasal dari kelompok II dan IV juga memiliki peluang yang besar untuk menghasilkan materi hibrida unggul.

Tabel 3. Rata-rata nilai jarak genetik antar kelompok klon kakao
Table 3. Average of genetic distance values between groups of cacao clones

	Kelompok			
	I	II	III	IV
I	-			
II	0,51	-		
III	0,53	0,59	-	
IV	0,54	0,74	0,56	-

Tabel 4. Karakter vegetatif 4 kelompok kakao dari Sulawesi Tenggara
Table 4. Vegetative characters observed in 4 clusters of cacao derived from Southeast Sulawesi

Kelompok	Lebar tajuk U-S (m)	Lebar tajuk B-T (m)	Tinggi pohon (m)	Lingkar batang (cm)	Panjang daun (cm)	Lebar daun (cm)	Panjang tangkai daun (cm)
I	3,34 b	3,34 b	2,83 b	32,47 b	25,96 a	10,11 a	2,14 a
II	3,93 a	4,08 a	3,12 ab	37,00 a	29,48 a	10,80 a	2,25 a
III	3,33 b	3,40 b	3,28 a	33,20 ab	25,87 a	10,01 a	2,20 a
IV	3,84 a	3,64 ab	2,60 b	36,96 a	25,55 a	11,20 a	2,17 a
Rata-rata	3,61	3,61	2,96	34,91	26,71	10,53	2,19

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Tukey taraf 5%; U-S = utara-selatan; B-T = barat-timur; pengamatan dilakukan pada kakao umur 5 tahun setelah grafting

Notes : *Numbers followed by the same letters in each column are not significantly different according to Tukey test at 5% level; N-S = north-south; W-E = west-east; observations were conducted at 5 years old cacao after grafting*

Tabel 5. Komponen buah dan biji pada 4 kelompok kakao dari Sulawesi Tenggara
Table 5. Pod and seed components in 4 cacao clusters derived from Southeast Sulawesi

Kelompok	Jumlah buah/pohon	Bobot buah (g)	Panjang buah (cm)	Lingkar buah (cm)	Panjang biji (mm)	Lebar biji (mm)	Tebal biji (mm)
I	14,57 b	413,68 b	16,94 b	25,91 a	20,25 b	11,13 b	5,75 c
II	11,67 b	563,40 a	20,63 a	27,05 a	24,21 a	11,81 ab	6,09 bc
III	14,16 b	460,01 ab	16,29 b	26,69 a	24,19 a	12,32 a	7,15 ab
IV	29,75 a	480,60 ab	19,28 a	26,46 a	20,48 b	11,59 b	7,17 a
Rata-rata	17,54	479,42	18,28	26,53	22,28	11,71	6,54

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Tukey taraf 5%; pengamatan dilakukan pada kakao umur 5 tahun setelah grafting
Notes : *Numbers followed by the same letters in each column are not significantly different according to Tukey test at 5% level; observations were conducted at 5 years old cacao after grafting*

Keragaman Klon Kakao Berdasarkan Karakter Morfologi

Karakterisasi morfologi merupakan langkah awal yang memegang peranan penting dalam proses identifikasi suatu jenis tanaman (Wardiana, Towaha, & Syafaruddin, 2017). Hasil analisis keragaman karakter vegetatif pada empat kelompok klon kakao dapat dilihat pada Tabel 4. Penampilan empat karakter vegetatif, yaitu lebar tajuk, tinggi pohon, dan lingkar batang menunjukkan perbedaan pada keempat kelompok klon kakao. Sementara itu, karakter panjang dan lebar daun, serta panjang tangkai daun tidak berbeda nyata pada semua kelompok. Dengan demikian, berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa karakter lebar tajuk, tinggi pohon, dan lingkar batang pada klon kakao lokal Sulawesi Tenggara lebih beragam dibandingkan dengan karakter panjang dan lebar daun, serta panjang tangkai daun. Oleh karena itu, ketiga karakter tersebut dapat digunakan sebagai pembeda antar klon untuk karakter vegetatif pada saat dilakukannya observasi.

Penampilan karakter buah yang meliputi jumlah, panjang, lingkar, dan bobot buah serta komponen biji (panjang, lebar, dan tebal biji) ditampilkan pada Tabel 5. Dari Tabel 5 diketahui bahwa kelompok IV yang terdiri dari klon Sultra 9 dan Kolut mempunyai jumlah buah terbanyak dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa kedua klon kakao pada kelompok IV dapat dikategorikan sebagai materi genetik unggul dalam program pengembangan varietas unggul baru. Selain itu hasil analisis menunjukkan bahwa bobot buah dan panjang buah berbeda nyata pada keempat kelompok kakao. Kelompok II mempunyai bobot buah yang lebih berat dibandingkan dengan kakao pada kelompok I, namun tidak berbeda nyata dengan kakao pada kelompok III dan IV. Pada karakter panjang buah, kelompok II dan IV mempunyai buah yang lebih panjang dibandingkan dengan kakao yang terdapat pada kelompok I dan III, sedangkan karakter lingkar buah tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada semua kelompok kakao. Hal ini menunjukkan bahwa karakter bobot buah dan panjang buah lebih beragam dibandingkan dengan lingkar buah pada klon kakao hasil eksplorasi di Sulawesi Tenggara. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa karakter bobot buah merupakan salah satu karakter komponen buah yang digunakan untuk mengelompokkan 33 aksesi kakao Kaliwining menjadi 2 kelompok (Wardiana *et al.*, 2017). Selanjutnya, pada karakter komponen biji yang meliputi panjang, lebar, dan tebal biji juga menunjukkan keragaman pada semua kelompok kakao. Klon kakao pada kelompok II dan III mempunyai biji dengan ukuran yang lebih panjang dan lebar dibandingkan kelompok lainnya, namun demikian klon kakao pada kelompok IV mempunyai biji yang lebih tebal dibandingkan dengan kelompok I dan II. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Martínez *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa penampilan fenotipik buah, yang meliputi warna buah, ketebalan kulit buah, jumlah biji, serta ukuran biji dan buah mempunyai variasi yang tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rata-rata jarak genetik yang didasarkan pada karakterisasi molekuler (Tabel 3) sejalan dengan performa tanaman pada beberapa karakter morfologi (Tabel 4 dan 5). Sebagai contoh, berdasarkan karakterisasi molekuler diketahui bahwa nilai jarak genetik antar kelompok II dan IV adalah paling tinggi (0,74), sesuai dengan hasil karakterisasi morfologi, yaitu jumlah buah, panjang biji, dan tebal biji yang nyata berbeda antar kedua kelompok tersebut. Demikian halnya antar kelompok I, II, dan III, yang mempunyai nilai jarak genetik lebih rendah (0,51–0,59) juga diketahui mempunyai performa morfologi yang sama pada beberapa karakter morfologi, yaitu panjang dan lebar daun, panjang tangkai daun, jumlah buah, dan lingkar buah. Hal ini menunjukkan bahwa hasil karakterisasi molekuler berdasarkan marka SSR relatif sejalan dengan hasil karakterisasi morfologi. Meskipun demikian, pada penelitian ini masih ditemukan adanya sedikit perbedaan antara hasil

karakterisasi molekuler dengan morfologi yang diduga disebabkan oleh relatif sedikitnya jumlah marka SSR yang digunakan, sehingga belum dapat mewakili semua sifat morfologi yang diamati pada penelitian ini. Kejadian ini serupa dengan hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Izzah, Randriani, & Dani (2015) pada kultivar kopi, yaitu mengelompokkan kopi dengan sifat morfologi yang berbeda pada kelompok yang sama. Namun, adanya hasil yang konsisten antar kedua pendekatan karakterisasi (molekuler dan morfologi) seperti yang ditunjukkan oleh kelompok II dan IV pada performa morfologi jumlah buah, panjang biji, dan tebal biji memberikan informasi yang menarik untuk diteliti lebih lanjut.

KESIMPULAN

Hasil analisis keragaman genetik berdasarkan marka SSR membagi klon kakao lokal yang berasal dari Sulawesi Tenggara menjadi 4 kelompok pada nilai kesamaan genetik 0,46. Berdasarkan nilai jarak genetik diketahui bahwa kelompok II dan IV mempunyai rata-rata nilai jarak genetik yang lebih tinggi (0,74) dibandingkan antar kelompok lainnya. Oleh karena itu, persilangan antar klon kakao yang berasal dari kelompok II dengan IV memiliki peluang yang besar untuk menghasilkan materi hibrida unggul. Selain itu, analisis menggunakan marka SSR juga berhasil mendeteksi adanya kemungkinan duplikasi pada klon yang dikoleksi, yaitu antar klon Sultra 5 dan Lokal 4 dengan kesamaan genetik 0,93, serta klon Lokal 2 dan Lokal 1 dengan kesamaan genetik 0,91. Hasil karakterisasi morfologi menunjukkan bahwa karakter lebar tajuk, tinggi pohon, lingkar batang, bobot buah, panjang buah, dan komponen biji berbeda nyata pada 4 kelompok klon kakao. Hasil penelitian juga menunjukkan adanya keterkaitan antara hasil karakterisasi molekuler dan morfologi yang ditunjukkan oleh kelompok II dan IV. Karakterisasi molekuler dan morfologi yang dilakukan terhadap klon kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara ini dapat dijadikan sebagai dasar pada saat memanfaatkan klon tersebut untuk kegiatan pemuliaan berikutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Ir. Khairiah dan para staf *Sub Station* Penelitian Kakao, Dinas Perkebunan dan Hortikultura, Provinsi Sulawesi Tenggara, yang terletak di Desa Lebojaya, Kecamatan Konda, Kabupaten Konawe Selatan, yang telah membantu terlaksananya penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Januar Firmansyah, SP., Tri Buana Dewi, dan Mira Sitepu, SSi., yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium. Penelitian ini didanai oleh DIPA Balittri T.A 2015.

DAFTAR PUSTAKA

Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W. F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, *1*(5), 2320–2325. http://doi.org/10.1038/nprot.2006.384

Martínez, I. B., de la Cruz, M. V., Nelson, M. R., & Bertin, P. (2017). Morphological characterization of traditional cacao (*Theobroma cacao* L.) plants in Cuba. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(1), 73–99. http://doi.org/10.1007/s10722-015-0333-4

Cosme, S., Cuevas, H. E., Zhang, D., Oleksyk, T. K., & Irish, B. M. (2016). Genetic diversity of naturalized cacao (*Theobroma cacao* L.) in Puerto Rico. *Tree Genetics and Genomes*, *12*(88), 1–13. http://doi.org/10.1007/s11295-016-1045-4

Dani, Izzah, N. K., & Randriani, E. (2016). Variasi genetik dalam populasi kultivar kopi Arabika berbuah kuning di lahan petani berdasarkan penanda SSRs. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, *3*(2), 83–94.

Direktorat Jenderal Perkebunan. (2017). *Statistik perkebunan Indonesia 2016-2018: Kakao*. Jakarta: Kementerian Pertanian.

Efombagn, M. I. B., Sounigo, O., Nyassé, S., Manzanares-Dauleux, M. J., & Eskes, A. B. (2009). Phenotypic variation of cacao (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *1*(6), 258–264.

Izzah, N. K., Randriani, E., & Dani. (2015). Analisis kekerabatan genetik kultivar kopi Arabika berbuah kuning dan berbuah merah berdasarkan marka SSR. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, *2*(3), 113–122.

Izzah, N. K., Lee, J., Perumal, S., Park, J. Y., Ahn, K., Fu, D., & Nam, Y. (2013). Microsatellite-based analysis of genetic diversity in 91 commercial *Brassica oleracea* L. cultivars belonging to six varietal groups. *Genet Resour Crop Evol*, *60*(7), 1967–1986. http://doi.org/10.1007/s10722-013-9966-3

Jing, R., Vershinin, A., Grzebyta, J., Shaw, P., Smýkal, P., Marshall, D., … Flavell, A. J. (2010). The genetic diversity and evolution of field pea (pisum) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evolutionary Biology, 10*(44), 1–20.

Lanaud, C., Risterucci, A. M., Pieretti, I., Falque, M., Bouet, A., & Lagoda, P. J. L. (1999). Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao* L. *Molecular Ecology, 8*(12), 2141–2152. http://doi.org/10.1046/j

Motamayor, J. C., Lachenaud, P., e Mota, J. W. D. S, Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, *3*(10), 1–8. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311

Nurbani, S. (2015). Eksplorasi dan karakterisasi tumbuhan mekai sebagai penyedap rasa di Kabupaten Bulungan, Provinsi Kalimantan Utara. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, *1*(2), 201–206.

Pugh, T., Fouet, O., Risterucci, A. M., Brottier, P., Abouladze, M., Deletrez, C., … Lanaud, C. (2004). A new cacao linkage map based on codominant markers: Development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet*, *108*(6), 1151–1161. http://doi.org/10.1007/s00122-003-1533-4

Reflinur, Lestari, P., & Lee, S. (2016). The potential use of SSR markers to support the morphological identification of Indonesian mungbean varieties. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, *17*(2), 65–74.

Rohlf, F. J. (2000). NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software. New York: Applied Biostatistics Inc.

Roorkiwal, M., Von Wettberg, E. J., Upadhyaya, H. D., Warschefsky, E., Rathore, A., & Varshney, R. K. (2014). Exploring germplasm diversity to understand the domestication process in *Cicer* spp. using SNP and DArT markers. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–10. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102016

Rubiyo, Izzah, N. K., Sulistiyorini, I., & Tresniawati, C. (2015). Evaluation of genetic diversity in cacao collected from Kolaka, Southeast Sulawesi, using SSR markers. *Indones. J. Agric. Sci.*, *16*(2), 71–78.

Santos, R. C., Pires, J. L., & Correa, R. X. (2012). Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. *s*pecies. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *59*(3), 327–345. http://doi.org/10.1007/s10722-011-9685-6.

Sujiprihati, & Syukur, M. (2012). Konservasi sumber daya genetik tanaman. In R. Poerwanto, I. Z. Siregar, & A. Suryani (Eds.), *Merevolusi Revolusi Hijau* (Buku III, pp. 528–536). Bogor: IPB Press.

Thomson, M. J., Septiningsih, E. M., Suwardjo, F., Santoso, T. J., Silitonga, T. S., & Mccouch, S. R. (2007). Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.,* 114, 559–568. http://doi.org/10.1007/s00122-006-0457-1

Tresniawati, C., Izzah, N. K., Sulistiyorini, I., & Wicaksono, I. N. A. (2017). Genetic variability of 11 local cacao clones derived from West Sumatra using SSR markers. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, *4*(2), 79–88.

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, *23*(1), 48–55. http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005

Wardiana, E., Towaha, J., & Syafaruddin. (2017). Pengelompokan 33 aksesi kakao berdasarkan karakter morfologi komponen buah. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, *4*(2), 67–78.

Wicaksono, I. N. A., 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.

Yang, J. Y., Scascitelli, M., Motilal, L. A., Sveinsson, S., Engels, J. M. M., Kane, N. C., … Cronk, Q. C. B. (2013). Complex origin of trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. *Tree Genetics and Genomes*, *9*(3), 829–840. http://doi.org/10.1007/s11295-013-0601-4