

ANALISIS SIDIK JARI DNA KEDELAI DENGAN MARKA SSR

*Puji Lestari, Andari Risliawati, Eny I. Riyanti, dan Dwinita W. Utami
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber
Daya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia*

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan tanaman kacang-kacangan menyerbuk sendiri yang kaya sumber protein dan minyak nabati sehingga penting sebagai sumber pangan untuk manusia dan pakan ternak. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi sampai saat ini diarahkan untuk meningkatkan produktivitas kedelai secara global dalam memenuhi kebutuhan ekonomi di berbagai negara penghasil kedelai. Di Indonesia, kedelai menempati posisi ketiga setelah padi dan jagung dimana berbagai produk olahan kedelai banyak dikonsumsi sebagian besar masyarakat.

Meskipun kedelai bukan merupakan tanaman asli Indonesia, koleksi plasma nutfah kedelai cukup banyak termasuk varietas unggul nasional (VUN) hasil pemuliaan (Balitkabi 2016). Selama ini karakterisasi morfologi secara rutin dilakukan untuk berbagai tujuan dalam pengelolaan plasma nutfah. Karakter morfologi dipengaruhi kuat oleh faktor lingkungan, sehingga pendekatan molekuler dapat menjadi alternatif karena metode tersebut lebih cepat dan akurat (Vu *et al.* 2013). Untuk mendukung proses seleksi dalam program pemuliaan, evaluasi dan karakterisasi

plasma nutfah kedelai secara morfologi dan molekuler perlu dilakukan secara beriringan.

Aplikasi sidik jari DNA pada tanaman kedelai pada umumnya ditujukan untuk identifikasi Genotipe, analisis keragaman genetik, sistematika dan taksonomi tanaman, filigeografi, dan studi genetik lainnya (Gunjaca *et al.* 2008; Lestari *et al.* 2016; Risliawati *et al.* 2015; Tasma *et al.* 2011; Tasma & Warsun 2009). Sejumlah marka molekuler baik yang digunakan secara terpisah ataupun kombinasi telah tersedia dan umum digunakan untuk analisis sidik jari DNA tanaman kedelai, yaitu diantaranya RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), STS (*Sequence tagged site*), SNP (*Single nucleotide polymorphism*) SSR (*Simple sequence repeat*) termasuk ISSR (*inter-simple sequence repeat*) dan STMS (*Sequence tagged microsatellites sites*) (Weising *et al.* 2005).

Marka SSR lebih sering digunakan dalam analisis sidik jari DNA karena tingkat polimorfisme dan reproduibilitasnya tinggi, level keahlian sumber daya manusia yang diperlukan medium sampai tinggi, dan pengoperasiannya dapat dilakukan dengan mesin semi otomatis (Agarwal *et al.* 2008; Yoon *et al.* 2009). Analisis SSR pada awalnya dilakukan dengan elektroforesis gel *poliakrilamid* dengan *silver staining*, kemudian *staining* menggunakan *etidium bromide* ataupun bahan *staining* yang lebih aman seperti *gelred*, *SybrGreen*, dan lainnya. Perkembangan teknologi terbaru untuk analisis alel SSR adalah dengan elektroforesis kapiler semi otomatis menggunakan marka berlabel *fluorescence* pada mesin *genetic analyzer* ataupun *fragment analyzer*. *Genetic analyzer* seperti CEQ8000 diketahui memiliki akurasi tinggi dan lebih cepat dalam mendeteksi variasi alel karena pengoperasiannya dapat dilakukan secara multipleks yang memungkinkan penggunaan beberapa marka dalam sekali *running* (Chaerani *et al.* 2009; Diwan dan Cregan 1997).

Analisis sidik jari DNA dengan marka SSR pada plasma nutfah kedelai telah dilakukan untuk berbagai tujuan terutama untuk bidang genetika molekuler (Chaerani *et al.* 2011; Lestari *et al.* 2016; Risliawati *et al.* 2015; Santoso *et al.* 2006; Yoon *et al.* 2009). Namun, sampai saat ini teknologi sidik jari DNA ini belum dimanfaatkan secara maksimal dalam meningkatkan manfaat sumber daya genetik (SDG) kedelai Indonesia dalam rangka pengembangan dan perlindungan varietas ke depannya. Tulisan ini membahas tentang teknologi marka molekuler untuk analisis sidik jari DNA tanaman dan pemanfaatannya untuk penelitian pertanian terutama untuk perlindungan dan konservasi SDG dan pemuliaan, dengan menitikberatkan pada kedelai, serta studi profil sidik jari DNA kedelai koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) menggunakan marka SSR.

TEKNOLOGI MARKA MOLEKULER

Teknik sidik jari DNA umumnya dilakukan berdasarkan identifikasi variasi dan kombinasi fragmentasi restriksi dan teknologi *polymerase chain reaction* (PCR). Namun demikian marka DNA yang dikembangkan berdasarkan teknologi PCR dianggap lebih lebih sederhana dan mudah. Beberapa varian marka molekuler yang dideteksi berdasarkan PCR di antaranya RAPD, AFLP, STMS, ISSR, dan SSR. Dengan berkembangnya teknologi sekuensing genom, telah dikembangkan teknologi marka generasi ketiga yang dikenal dengan SNP). Teknik mutakhir ini membantu menurunkan biaya analisis dan kandungan informasi marka.

Mengingat pemilihan teknik sidik jari DNA tergantung pada fasilitas prasarana dan sarana, SDM dan biaya penelitian, maka diperlukan dasar penting pemanfaatan jenis marka molekuler terkait kemampuan diskriminasi dan tingkat kepercayaan dalam

uji. Marka molekuler generasi awal seperti RAPD memiliki kemampuan diskriminasi lebih rendah dibandingkan AFLP dan SSR, walaupun RAPD ini dapat digunakan di area dalam genom sebagai target yang lokasinya tidak diketahui. Sampai saat ini SSR menjadi salah satu alternatif marka molekuler yang banyak diaplikasikan pada berbagai spesies tanaman dengan berbagai tujuan baik pada tahapan pra-pemuliaan maupun diagnosis karakter yang diinginkan.

SSR menunjukkan variasinya yang tinggi dalam genom tanaman, mutasi tinggi, dan bersifat kodominan. SSR merupakan sekuen DNA motif berulang pendek dan tandem dengan 2–5 unit nukleotida. SSR tersebut terdiri dari lokus atas ratusan alel dengan ukuran basa yang berlainan. Aplikasi teknik SSR cukup sederhana dibandingkan dengan AFLP ataupun SNP. Penggunaan marka SSR pertama kali pada tanaman pada tahun 1992. Marka ini membuktikan sebagai alat yang potensial untuk mendiskriminasi antara Genotipe tanaman, studi populasi, *tagging* gen dan pemetaan keterpautan. Beberapa studi membuktikan peluang pemanfaatannya sebagai marka yang dapat ditransfer pada spesies lain pada genus yang sama atau bahkan pada genus yang berbeda. SSR dengan DNA berulang termasuk jenis marka yang banyak digunakan untuk analisis sidik jari DNA (Squirrell *et al.* 2003; Weising *et al.* 2005).

PEMANFAATAN PROFIL SIDIK JARI DNA UNTUK PENELITIAN PERTANIAN

Profil sidik jari DNA dibuat sebagai data awal untuk analisis lanjutan sesuai tujuan penelitian. Pemanfaatan sidik jari DNA untuk identifikasi Genotipe meliputi profil unik/spesifik pada individu sebagai identitas genetik, identifikasi kultivar khususnya untuk tujuan perlindungan varietas, estimasi variasi

somaklonal dan materi genetik hasil propagasi *in vitro*, dan mutan hasil mutagenesis baik secara kimia maupun fisik.

Keragaman genetik berdasarkan profil sidik jari penting untuk mengidentifikasi variasi antar kultivar dan kekerabatannya, analisis populasi genetik, hibridisasi dan introgresi, konservasi tanaman, karakterisasi dan preservasi plasma nutfah baik koleksi bank gen maupun untuk koleksi inti (*core collection*). Selain itu, sidik jari DNA juga diperlukan pada studi sistematika dan taksonomi tanaman marka DNA seperti SSR. Analisis sidik jari dapat dimanfaatkan juga untuk filogeografi yang dibuat berdasarkan DNA kloroplas maupun gen pada inti sel (Weising *et al.* 2005).

Sidik jari DNA yang spesifik untuk individu tertentu diperlukan dalam menelusuri asal usul suatu individu Genotipe. Marka SSR efektif untuk analisis forensik *Cannabis sativa* sebagai obat yang ikut menentukan tipe agronomi dan asal geografinya. cpSSR (SSR kloroplas) bermanfaat dalam menentukan asal-usul sampel dalam populasi. Selain itu, identifikasi kultivar secara efektif, cepat, dan tepat, penting untuk tujuan pemuliaan dan proteksi hak-hak secara layak (Camlin, 2003).

Pemanfaatan sidik jari DNA penting untuk perlindungan varietas khususnya identifikasi kultivar/Genotipe yang banyak dilakukan pada berbagai spesies tanaman. Varietas yang dilepas maupun plasma nutfah elit serealia, tanaman penghasil gula dan minyak, sayuran dan kacang-kacangan telah dianalisis profil sidik jari DNA-nya. Total 2146 Genotipe, termasuk 75 varietas kedelai pada koleksi National Research Center, India telah dikarakterisasi molekuler dengan marka SSR, AFLP dan RAPD. Selain itu sidik jari DNA dapat diaplikasikan untuk data dukung patendari fragmen gen berserta fungsinya (Kumar 2003; Shaw *et al.* 2009).

Keuntungan analisis sidik jari berdasarkan marka molekuler dibandingkan dengan morfologi adalah polimorfismenya yang tinggi, tidak dipengaruhi faktor lingkungan dan pola pewarisannya sederhana. Berdasarkan kelebihan tersebut, marka molekuler

ini sangat sesuai untuk uji BUSS (Baru, Unik, Seragam, Stabil) varietas yang didaftarkan atau yang telah dilepas, sehingga sidik jari DNA merupakan identitas unik varietas tersebut. Pemulia dapat mengklaim varietas yang dikembangkan berdasarkan profil molekuler sebagai informasi pendukung untuk pembeda varietas. Karena itulah analisis molekuler dilakukan sebaiknya pada tahap pra skrining yang menentukan perbedaan varietas (Weising *et al.* 2005).

Sidik jari DNA juga dianggap penting untuk perlindungan Hak Kekayaan Intelektual (HKI) dan biodiversitas. Kasus pelanggaran HKI dapat terjadi ketika varietas yang telah terdaftar, dipasarkan tidak otentik sesuai namanya, produk dari sebuah materi tanaman (benih) dijual dengan nama sebuah varietas lain yang telah terdaftar, dan materi tanaman yang dikoleksi dari spesies liar dan dieksploitasi secara komersial tanpa otorisasi pihak biodiversitas berwenang. Bukti pelanggaran terkait HKI memerlukan identifikasi cepat dan jelas yang memungkinkan dapat dipenuhi dengan teknik sidik jari DNA (Weising *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015).

Fenomena variasi somaklokal menyebabkan perbedaan regenerasi dengan tetuanya. Variasi juga muncul saat perbanyakan *in vitro*. Variasi somaklonal variasi sering diekspresikan dengan perbedaan fenotipe, namun variasi tersebut kadang tidak dapat dideteksi secara marka molekuler berbasis karakterisasi tanpa mempertimbangkan formulasi marka. Suatu kemajuan bagus bahwa marka molekuler berhasil mengidentifikasi variasi somaklonal pada padi, kelapa sawit, tebu dan lainnya berdasarkan AFLP, dan RAPD (Singh *et al.* 2010). Selain itu, marka SSR telah digunakan dan berhasil untuk skrining instabilitas *Brassica oleracea* hasil kultur *in vitro*. Di lain pihak, mutasi suatu spesies tanaman baik secara somaklonal, spontan, induksi dengan radiasi atau kimia yang dideteksi dengan marka

molekuler bergantung pada jumlah total mutasi, tipe marka dan jumlah serta ukuran genomnya (Weising *et al.*, 2005)

Marka molekuler baik fungsional yang terkait gen spesifik maupun yang bersifat acak posisinya di kromosom dalam genom, bermanfaat untuk estimasi keragaman genetik dan kekerabatan spesies tanaman termasuk kedelai. Marka molekuler yang dipilih untuk analisis keragaman genetik harus dapat membedakan antar kultivar yang sangat dekat genetiknya. Tingkat kekerabatan antar kultivar perlu diperkirakan termasuk jarak genetik dengan kerabat liarnya. Dengan demikian perluasan variasi genetik suatu koleksi SDG dan populasi diperlukan. Pengetahuan tentang asal hibrida suatu tanaman juga penting karena terkait dengan identifikasi kultivar, manajemen konservasi, atau pemahaman biologi suatu spesies. Sidik jari DNA dapat membantu mengidentifikasi spesies asal atau Genotipe yang berkontribusi pada hibrida. Marka DNA nukleus diperlukan karena umumnya berasal dari kedua tetua dalam proporsi yang kurang lebih sama (Saeed dan Barozai 2012; Weising *et al.*, 2005).

Marka molekuler berperan dalam konservasi biologi. Beberapa teknik marka DNA dianjurkan untuk digunakan untuk meneliti level variasi genetik dari potensi adaptif populasi (Weising *et al.* 2005). Marka RAPD dapat digunakan untuk menganalisis variasi genetik spesies tanaman yang hampir punah, *Borderea choardii* dan *B. pyrenaica*. Spesies yang dekat genetiknya, misalnya *Menxiesia goyozanensis* dan genus *Zelkova* perlu didiferensiasi dengan marka molekuler. SSR sesuai digunakan untuk menentukan variasi pada *Cypripedium calceolus*. Dengan demikian identifikasi keragaman genetik atau evolusinya dari spesies hampir punah diperlukan untuk tujuan konservasi dan pemanfaatannya yang harus re-introduksi. Kecuali itu, sidik jari DNA penting untuk karakterisasi plasma nutfah khususnya keragaman genetik tanaman tertentu, kultivar lama dan baru, lokal/

traditional dan spesies kerabatnya. Profil sidik jari DNA diperlukan dalam mengetahui perluasan variasi genetik SDG, aspek geografi dan ekologi, serta penelusuran asal usul spesies dan kultivar (Segarra-Moragues dan Catalan 2003; Segarra-Moragues *et al.*, 2004).

APLIKASI MARKA MOLEKULER UNTUK SIDIK JARI DNA KEDELAI

Berbagai bentuk ulangan sikuen (*sequence repeat*) termasuk minisatelit dan mikrosatelit (SSR), dan SNP maupun indels merupakan petunjuk adanya variasi di dalam genom tanaman termasuk kedelai. Namun demikian variasi genetik antara aksesi kedelai budi daya dilaporkan cukup rendah (Hyten *et al.* 2006; Yanagisawa *et al.* 1994). Aplikasi marka molekuler untuk analisis sidik jari pada kedelai dilakukan terutama untuk karakterisasi plasma nutfah dalam hubungannya dengan konservasi dan membantu program pemuliaan. Marka molekuler terbukti berperan dalam menduga keragaman genetik dan studi genetik pada plasma nutfah kedelai (Nugroho *et al.* 2017; Tasma *et al.* 2018; Tasma *et al.* 2008; Terryana *et al.* 2017). Analisis BUSS untuk keperluan pelepasan varietas sebagai identitas genetik dan identifikasi kultivar untuk membantu pengelolaan plasma nutfah kedelai juga menjadi perhatian (Lestari *et al.*, 2016; Risliawati, *et al.* 2015). Dalam bab ini dibahas hanya marka yang berbasis PCR.

Pemanfaatan marka RAPD telah digunakan untuk analisis genom kedelai pada tahun 1990–an. RAPD secara luas digunakan untuk analisis keragaman genetik plasma nutfah kedelai (Nikolic *et al.* 2007; Drinic Mladenovic *et al.* 2008). RAPD memberi informasi kedekatan genetik tetua persilangan dan varietas yang sekaligus dapat menduga karakter progeni (Peric 2008). Sedangkan DNA *Amplification Fingerprinting markers* (DAF) yang juga dimulai tahun 1990–an di kedelai (Prabhu dan Gresshoff 1994)

merupakan primer yang memilih *arbitrarily* lebih pendek daripada RAPD. Marka RAPD menggunakan gel agarosa, sementara DAF menggunakan gel poliakrilamid. Sampai sekarang teknologi AFLP masih terus dikembangkan dan disempurnakan. AFLP kurang mendapat perhatian pemanfaatannya pada spesies tanaman mengingat keberhasilan aplikasi marka SSR khususnya pada komoditas kedelai. Di lain pihak pada tanaman kedelai frekuensi pemanfaatan SNP sebagai marka genetik diintensifkan dan menjadi penting kedepannya untuk analisis genom dan manipulasi genetik (Liu *et al.* 2017; Singh *et al.* 2010).

Marka SSR telah sering digunakan untuk analisis sidik jari DNA berbagai populasi atau aksesori kedelai. Aplikasi marka SSR pada genom tanaman pertama kali adalah pada kedelai, ketika pada awal tahun 1990-an dilaporkan hasil SSR dengan level polimorfisme tinggi dan lokus spesifik (Diwan & Cregan 1997; Plaschke *et al.* 1995; Song *et al.* 1999). Marka SSR diketahui mampu membedakan Genotipe yang mempunyai kedekatan secara genetik (Singh *et al.* 2010). Lokus marka SSR dalam jumlah kecil sudah mampu mengidentifikasi kultivar kedelai. Sebanyak sembilan marka SSR berhasil untuk mengidentifikasi 83 kultivar kedelai dari Heilongjiang, Cina (Gao *et al.* 2009), 12 marka SSR dapat membedakan 103 kultivar elit kedelai (Liao & Qiu 2007), dan 13 marka SSR mampu membedakan 66 kultivar elit Amerika (Song 1999).

Di Indonesia pengembangan marka SSR digunakan untuk identifikasi kultivar dengan identitas spesifik pada kedelai masih terbatas sampai saat ini. Sebagai contoh, enam marka SSR berhasil dibuat untuk membuat identitas genetik pada 29 varietas lokal asal Indonesia (Lestari *et al.* 2016) dan hanya lima marka SSR cukup untuk membuat identitas dari 42 VUN hasil pemuliaan di Indonesia (Risliawati *et al.* 2015). Berbagai varietas/aksesori kedelai dari Asia berhasil diidentifikasi kedekatan genetik (Li *et al.* 2010; Wang *et al.* 2003; Xie *et al.* 2003) dan keragaman

genetiknya sekaligus membandingkan efektivitas prosedur pemuliaan melalui seleksi tetua persilangan (Li *et al.* 2011). Dengan demikian sejumlah SSR dalam bentuk set marka telah dikembangkan untuk analisis sidik jari DNA kedelai. Manfaat dari SSR pada kedelai tersebut terbukti selain untuk profil sidik jari DNA juga penting membantu seleksi dalam pemuliaan maupun studi genetik lainnya.

STUDI PROFIL SIDIK JARI DNA KEDELAJ KOLEKSI BB BIOGEN DENGAN MARKA SSR

Mengingat begitu banyak progress SSR pada kedelai, maka SSR dipilih untuk analisis sidik jari DNA koleksi plasma nutfah kedelai Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Tabel 1.6). Berdasarkan berbagai kelebihan SSR dan kedekatan genetik antara aksesori kedelai, maka sejumlah primer SSR khusus kedelai dipilih dari database kedelai (Soybase 2013, www.soybase.org) untuk analisis sidik jari DNA. Total 35 primer SSR yang menghasilkan amplikon tunggal dan menunjukkan polimorfisme antara aksesori digunakan untuk analisis. Primer SSR dicari dari database tersebut tersebar di hampir seluruh 20 kromosom kedelai dengan variasi SSR sebanyak dua (TA, AT, TC, CT), tiga (TTA, ATA, TAA) dan empat basa (AAAT) dengan level pengulangan yang berbeda. Akhirnya total 35 primer yang menghasilkan amplikon tunggal dan digunakan sejak tahun 2004, 2007-2008 dan 2011 dipilih untuk analisis dalam studi ini (Tabel 1.6, 1.7).

Sejumlah aksesori kedelai diobservasi pada analisis ini yang terdiri dari SDG introduksi, varietas lokal, varietas unggul nasional (VUN), galur harapan dan beberapa Genotipe yang tidak diketahui latar belakang genetiknya. Masing-masing 10

Tabel 1.6. Jumlah aksesi kedelai dan primer SSR yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA menggunakan CEQ8000 di BB Biogen

Tahun	Total aksesi	Introduksi	Var. lokal	Galur	VUN	Tidak diketahui	Jumlah primer
2004	96	16	40	12	26	2	10
2007	50	10	19	9	0	12	10
2008	96	24	22	41	2	7	10
2011	96	4	27	19	1	45	23

prime digunakan pada tahun kegiatan tahun 2004, 2007-2008 dan 23 primer pada tahun 2011 di BB Biogen (Tabel 1.7). Parameter *polymorphic information content* (PIC) digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi kekuatan diskriminasi tiap primer. Untuk memudahkan dalam pemanfaatan selanjutnya, telah dicatat nilai PIC tiap marka yang digunakan dalam survei koleksi kedelai BB Biogen sampai tahun 2011.

Profil sidik jari DNA sangat memerlukan validitas data profil sidik jari DNA. Karena itu pengulangan analisis dilakukan pada primer dan aksesi kedelai. Daftar aksesi kedelai yang diulang analisisnya beserta informasi penggunaan markanya ditampilkan pada Tabel 1.8. Berdasarkan total 96 aksesi yang digunakan masing-masing pada tahun 2004, 2007 dan 2011, dan 50 aksesi tahun 2008, tercatat ada 48 aksesi dengan nomor registrasi yang sama di observasi lebih dari 1 kali dalam kurun waktu tersebut (Tabel 1.8). Studi sebelumnya menunjukkan tentang akurasi deteksi SSR menggunakan Genetic Analyzer (Chaerani *et al.* 2009, 2011; Santoso *et al.* 2006; Thomson *et al.* 2007). Hasil deteksi dengan CEQ8000 yang dilaporkan ada toleransi selang ukuran alel SSR yang mampu dideteksi pada primer yang sama yaitu sekitar 1-10. Namun demikian hasil analisis menunjukkan bahwa ada aksesi yang diulang dengan primer dan tahun yang sama memberikan pola ukuran alel yang benar-benar sama. Namun demikian pengulangan pada tahun yang berbeda pada aksesi

Tabel 1.7. Informasi primer SSR yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA koleksi plasma nutfah kedelai di BB Biogen

Primer	2004	2007	2008	2011	Frekuensi Validasi (kali)	PIC ^a	Jumlah observasi akses	Ukuran produk (bp)	Motif pengulangan	Kromosom
Satt002		v			1	0,8276	36		(TA)5gtgacgatttaaaaaataa(AT)5	17
Satt005		v			1	0,8233	44		(TTA)21	2
Satt009	v		v	v	3	0,9128	190	141–250	(AAAT)3(AAT)13*	3
Satt038	v		v	v	3	0,8776	274	157–190	(ATA)17	18
Satt042		v			1	0,3779	44			5
Satt063		v			1	0,3222	47		(TAA)20	14
Satt114	v		v	v	3	0,8873	288	71–120	(AAT)17	13
Satt131				v	1	0,9511	92	111–320	(TAT)13	18
Satt142		v			1	0,6236	29		(TTA)20	12
Satt143		v			1	0,1933	45			19
Satt147	v		v	v	3	0,8855	238	100–327	(ATA)15	1
Satt177	v		v	v	3	0,8210	288	101–120		8
Satt191				v	1	0,7348	94	191–240	(TAT)19	18
Satt222				v	1	0,9685	42	234–255		12
Satt230				v	1	0,8975	68	100–400		15
Satt242	v		v	v	3	0,9044	284	103–160	(TTA)26	9
Satt243	v		v		2	0,7999	189	261–294	(TAT)17	10
Satt263		v			1	0,5997	50		(TTA)19	15
Satt285				v	1	0,8513	84	100–400	(TTA)19	16
Satt294			v	v	2	0,8928	191	251–301	(TAT)23	4
Satt295	v				1	0,5209	91	253–301	(TAT)20	1
Satt300				v	1	0,9240	80	100–400		5
Satt308	v		v	v	3	0,9179	262	142–330	(TTA)22	7
Satt373				v	1	0,7286	96	151–170	(TAT)21	19
Satt409				v	1	0,9650	62	188–207		81
Satt414	v		v	v	3	0,9123	269	160–380		6
Satt516				v	1	0,8832	77	131–270	(TAA)19	13
Satt534				v	1	0,7603	96	101–230	(TAT)30	14
Satt571		v			1	0,7159	48		(ATA)14	20
Sat_022				v	1	0,9669	67	270–300		17
Sat_043				v	1	0,9557	51	296–325	(AAAT)4(AT)20*	9
Sat_069				v	1	0,9698	71	177–197	(TA)8c(AT)21	2
Sct_026		v			1	0,3034	49			11
Sct_028		v			1	0,8938	46		(TC)5	6
Sct_188				v	1	0,9399	33	190–210	(CT)13	13

dan primer yang sama ternyata memberikan pola ukuran alel yang tidak sebagian tidak konsisten pada batas selang deteksi CEQ800.

Validasi analisis sidik jari DNA untuk melihat konsistensi ukuran alel pada aksesori kedelai dan primer SSR yang sama ditampilkan pada Tabel 1.9. Berdasarkan hasil validasi tiap marka antara satu sampai tiga terbukti bahwa marka terpilih tersebut menunjukkan reproduktibilitas dan robustness seperti tergambar dari variasi ukuran alel dalam selang batas toleransi deteksi CEQ8000. Nilai rata-rata PIC cukup tinggi pada total marka yang digunakan yaitu 0.786 dengan selang antara 0.193–0.97. Hasil

Tabel 1.8. Daftar total 48 aksesi kedelai dengan nama dan nomor registrasi sama yang dianalisis sidik jari DNAny lebih dari satu kali

REG	Nama	2004	2007	2008	2011	Keterangan
947	Avoyelles 17193		x	x		Tidak ada pengulangan primer
993	Hampton		x		x	Tidak ada pengulangan primer
1248	Davros	x			x	A
1340	Davros x 945/0/0/2		x		x	Tidak ada pengulangan primer
1343	Orba		x		2x	Tidak ada pengulangan primer
1459	Samarinda	2x				
1643	CES-407	x			x	A
3458	Tidar	x			x	A
3459	Guntur				2x	
3460	Wilis		x		x	Tidak ada pengulangan primer
3462	Tambora	x			x	A
3463	Lokon		x		x	Tidak ada pengulangan primer
3464	Lompobatang		x		2x	Tidak ada pengulangan primer
3469	Dieng	3x			x	A
3570	1682/1248	x			x	A
3592	M2667 Lokal Madiun		x		x	Tidak ada pengulangan primer
3607	Lokal Tulungagung		x	x		Tidak ada pengulangan primer
3628	AVRDC G.2120-MG	x		x		B
3639	G.2120-MB			x	x	C
3647	Lokal Banyuwangi			x	x	C
3659	M2787		x	x		Tidak ada pengulangan primer
3702	Lokal Karang asem	2x				
3728	Kedele Hibrida	x			x	A
3835	IAC-100	2x		x		B
3851	Malabar	x			x	A
3918	GM216Si		x	x		Tidak ada pengulangan primer
4116	Pangrango		x		x	Tidak ada pengulangan primer
4127	Lokal Cirebon/CRB-2		x		x	Tidak ada pengulangan primer
4194	Lokal Ongko-2	x			x	A
4200	30104-1-3	2x				
4226	Lokal Bima Kuning	x			x	A
4283	Singgalang	2x				
4367	Leuser	x			x	A
4368	Kawi	x			x	A
4371	Anjasmoro	x			x	A
4372	Sindoro	x			x	A
4373	Agromulyo	2x			x	A
4376	Menyapa	x			x	A
4378	Tanggamus	x			x	A
4385	Burangrang		x		x	Tidak ada pengulangan primer
4396	GM2782Si		x	x		Tidak ada pengulangan primer
4402	GM 4596 Si	x		x		B
4415	Rajabasa			x	2x	C
4424	Kaba		x		x	Tidak ada pengulangan primer
4429	Dhetam-1			x	x	C
4430	Dhetam-2			x	x	C
4431	Gepak Kuning			x	x	C
4432	Gepak Ijo			x	x	C

Penggunaanan sejumlah primer SSR yang sama untuk aksesi tertentu pada tahun berbeda:

A = 2004, 2011, Satt009, Satt038, Satt114, Satt147, Satt177, Satt242, Satt308, Satt414, B = 2004, 2008, Satt009, Satt038, Satt114, Satt147, Satt177, Satt242, Satt308, Satt414, Satt243, C = 2008, 2011, Satt009, Satt038, Satt114, Satt147, Satt177, Satt242, Satt308, Satt414, Satt294

Tabel 1.9. Validasi analisis sidik jari DNA untuk melihat konsistensi ukuran alel pada aksesori kedelai dan primer SSR yang sama

REG	Code	Nama	Tahun	Satt009	Satt038	Satt114	Satt147	Satt177	Satt242	Satt308	Satt414
1248	A	Davros	2004	174	172	116	192	108	151	151	310
			2011	181	181	115	?	104	146	?	190
1643	A	CES-407	2004	174	172	95	192	111	145	169	304
			2011	181	171	93	?	104	143	208	300
3458	A	Tidar	2004	183	175	116	192	114	145	151	301
			2011	179	173	111	100	107	140	200	300
3462	A	Tambora	2004	183	172	116	192	105	154	169	310
			2011	181	169	113	106	104	146	200	266
3469	A	Dieng	2004	186	175	95	192	117	154	151	?
			2004	186	175	95	192	117	154	151	301
			2004	186	175	95	192	117	154	151	301
			2011	173	169	93	150	104	140	190	300
3570	A	1682/1248	2004	183	178	95	192	111	145	151	292
			2011	181	175	93	150	107	140	192	?
3728	A	Kedele Hibrida	2004	183	190	116	192	114	145	133/154	301
			2011	173	189	93	120	107	140	240	304
3851	A	Malabar	2004	180	172	95	192	111	154	148	301
			2011	177	169	93	146	110	149	190	?
4194	A	Lokal Ongko-2	2004	177	172	116	192	117	145/160	151	292
			2011	175	169	115	150	116	143	191	291
4226	A	Lokal Bima Kuning	2004	246	?	95	192	108	139/154	151	310
			2011	237	173	93	142	107	143	190	308
4367	A	Leuser	2004	216	172	98	192	111	145	151	301
			2011	181	177	93	145	113	146	204	302
4368	A	Kawi	2004	177	175	95	270	108	154	151	301
			2011	175	?	93	?	107	146	?	292
4371	A	Anjasmoro	2004	201	178	116	213	114	151	148	313
			2011	175	173	93	?	107	143	192	300
4372	A	Sindoro	2004	177	178	116	213	114	145	154	310
			2011	177	177	113	112	113	143	?	166
4373	A	Agromulyo	2004	175	178	119	216	114	151	151	307
			2004	183	172	95	210	108	151	169	301
			2011	213	?	93	146	104	146	190	296
4376	A	Menyapa	2004	177	175	116	207	114	145	151	301
			2011	175	173	93	150	104	143	190	300
4378	A	Tanggamus	2004	177	178	116	207	114	151	133	301
			2011	175	177	115	128	104	146	208	300
3835	B	IAC-100	2004	180	172	95	192	111	151	169	304
			2004	177	172	95	192	111	151	169	?
			2008	64	156	94	204	108	133	146	300
4402	B	GM 4596 Si	2004	183	172	116	192	114	145	151	301
			2008	168	178	108	?	110	133	144	302
3628	B	AVRDC G.2120-MG	2004	183	175	116	192	114	145	151	301
			2008	182	173	98	?	110	139	146	294
3639	C	G.2120-MB	2008	182	173	116	190	112	123	146	290
			2011	207	173	93	120	110	140	220	?
3647	C	Lokal Banyuwangi	2008	172	187	80	?	110	129	146	292
			2011	181	175	93	120	113	149	205	299
4415	C	Rajabasa	2008	94	171	94	188	112	125	146	298
			2011	175	175	93	146	113	143	?	172
4429	C	Dhetam-1	2008	176	175	94	188	110	137	146	296
			2011	175	177	93	132	113	137	192	?
4430	C	Dhetam-2	2008	174	173	94	186	110	135	146	290
			2011	175	173	93	112	110	146	?	376
4431	C	Gepak Kuning	2008	174	174	94	190	110	135	144	300
			2011	209	175	93	152	113	143	190	300
4432	C	Gepak Ijo	2008	176	189	84	191	110	136	148	290
			2011	175	189	93	138	113	146	200	300
1459		Samarinda	2004	177	172	116	210	108	145	151	301
			2004	177	172	95	189	108	145	169	304
3702		Lokal Karang asem	2004	177	190	107	207	114	151	151	301
			2004	183	175	95	210	108	145	151	301
4200		30104-1-3	2004	177	172	95	207	108	151	169	310
			2004	177	172	95	207	108	151	169	310
4283		Singgalang	2004	177	172	95	192	108	154	148	310
			2004	180	178	116	192	105	151/154	133	301
3459		Guntur	2011	175	173	91	108	104	146	189	302
			2011	177	171	93	146	104	146	200	308

evaluasi ini juga menunjukkan keunikan alel SSR dari lokus yang terpilih terutama alel yang terhitung jarang ditemukan di aksesori kedelai seperti Sct_188, Satt002 dan Satt142) dan alel dengan frekuensi tinggi (Satt114, Saat147, Saat177, Satt242, Satt308, Satt414) (Tabel 1.7). Contoh lanjutan analisis dalam pembuatan identitas Genotipe atau ID genetik pada kedelai koleksi BB Biogen tersebut dapat dilihat di publikasi sebelumnya (Risliawati et al. 2015; Lestari et al. 2016). Formulasi set marka SSR telah dikembangkan untuk membuat identitas spesifik aksesori kedelai lokal dan VUN.

Set marka SSR beserta ID genetik Genotipe/varietas menjadi pendukung karakter spesifik morfologi untuk perlindungan varietas lokal dengan status asal geografi atau asal-usul maupun VUN hasil pemuliaan oleh pemulia. Profil sidik jari DNA berupa koding digital sebagai identitas genetik varietas kedelai Indonesia melengkapi sistem koding yang telah ada yang bertujuan untuk memproteksi SDG. Pengembangan set marka tidak hanya diaplikasikan di kedelai komersial dan varietas elit. Formulasi set marka SSR untuk identifikasi genotip identitas kemungkinan akan berubah dan harus diperbaharui sejalan dengan penambahan genotip/varietas. Namun metode dan teknik yang digunakan dalam mengembangkan marka profil sidik jari DNA tersebut dapat diaplikasikan secara konsisten. Pengembangan ID kedelai dalam studi ini dapat diterapkan di Indonesia, terutama untuk melindungi plasma nutfah lokal pencitra daerah tertentu di Indonesia. Hasil tersebut menunjukkan bahwa marka SSR tidak hanya bermanfaat untuk analisis sidik jari DNA kedelai BB Biogen-Balitbangtan namun juga potensial untuk diaplikasikan pada koleksi plasma nutfah kedelai lainnya ataupun studi genetik lainnya.

KESIMPULAN

Teknologi marka molekuler berbasis PCR di antaranya RAPD, AFLP, STMS, ISSR, dan SSR telah diaplikasikan pada berbagai spesies tanaman. Marka SSR dengan DNA berulang menjadi alternatif untuk analisis sidik jari DNA. Analisis sidik jari DNA tanaman termasuk kedelai ditujukan untuk identifikasi genotipe, analisis keragaman genetik, sistematika dan taksonomi tanaman, dan filogeografi. Sejumlah SSR dalam bentuk set marka telah dikembangkan untuk analisis sidik jari DNA kedelai. Manfaat dari SSR baik acak di genom maupun terkait gen spesifik pada kedelai terbukti selain untuk profil sidik jari DNA juga penting membantu seleksi dalam pemuliaan maupun studi genetik lainnya. Set marka SSR beserta ID genetik genotip/varietas koleksi BB Biogen dapat menjadi pendukung karakter spesifik morfologi untuk perlindungan varietas lokal dengan status asal geografi atau asal-usul maupun VUN hasil pemuliaan oleh pemulia. Formulasi set SSR telah dikembangkan dan tidak hanya bermanfaat untuk membuat profil sidik jari DNA akses lokal dan VUN kedelai Indonesia, namun potensial untuk diaplikasikan pada koleksi plasma nutfah kedelai lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27:617-631.
- Balitkabi. (2016). Deskripsi varietas unggul kedelai 1918-2016. Malang (Indonesia): Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi.
- Camlin MS. (2003). Plant cultivar identification and registration — the role for molecular techniques. *Acta Hort.* 625:37-47.

- Chaerani, Hidayatun N, Utami DW. (2009). Pengembangan set multipleks penanda DNA mikrosatelit untuk analisis variasi genetik padi dan kedelai. *J AgroBiogen*. 5(2):57-64.
- Chaerani, Hidayatun N, Utami DW. (2011). Keragaman genetik 50 varietas plasma nutfah kedelai berdasarkan 10 penanda mikrosatelit. *J AgroBiogen*. 7:96-105.
- Diwan N, Cregan PB. (1997) Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Applied Genet*. 95:723-733.
- Gao YL, Zhu RS, Liu CY, Li WF, Jiang HW, Li CD, Yao BC, Hu GH, Chen QS. (2009). Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China. *Acta Agronom Sinica*. 35:211-218.
- Gunjaca J, Buhinicek I, Jukic M, Sarcevic H, Vragolovic A, Kozic Z, Jambrovic A, Pejic I. (2008). Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica*. 161:165-172.
- Hyten DL, Song Q, Zhu Y, Choi IY, Nekson RL, Costa JM, Specht JE, Shoemaker RC, Cregan PB. (2006). Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:16666-16671.
- Kumar J. (2004). Biotechnology patenting. *J Intellect Prop Rights*. 9:471-480.
- Lestari P, Risliawati A, Utami DW, Hidayatun N, Santoso TJ, Chaerani. (2016). Pengembangan identitas spesifik berbasis marka SSR pada 29 varietas kedelai lokal Indonesia. *J Biol Indones*. 12:219-230.
- Li YH, Smulders MJ, Chang RZ, Qiu LJ. (2010). Analysis of SSRs uncovers hierarchical structure and genetic diversity in Chinese soybean landraces. *Agric Sci China*. 9:1739-1748.

- Li, YH, Smulders MJM, Chang RZ, Qiu LJ. (2011) Genetic diversity and association mapping in a collection of selected Chinese soybean accessions based on SSR marker analysis. *Conserv Genet.* 12:1145-1157.
- Liao Q, Qiu LJ. (2007). DNA fingerprint of main soybean varieties in China. Beijing (China): China Agriculture Press.
- Liu X, Li J, Fan X, Htwe NMP, Wang S, Huang W, Yang J, Xing L, Chen L, Guan R, Chang R, Wang D, Qiu L. (2017) Assessing the numbers of SNPs needed to establish molecular IDs and characterize the genetic diversity of soybean cultivars derived from Tokachi nagaha. *Crop J.* 5:326-336.
- Murray MG, Thompson WF. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4326.
- Nugroho K, Terryana RT, Reflinur, Asadi, Lestari P. (2017). Analisis keragaman genetik kedelai menggunakan marka mikrosatelit. *J AgroBiogen.* 41:121-132.
- Plaschke J, Ganai MW, Röder MS. (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Applied Genet.* 91:1001-1007.
- Risliawati A, Riyanti EI, Lestari P, Utami DW, Silitonga TS. (2015). Development of SSR marker set to identify fourty two Indonesian soybean varieties. *J AgroBiogen.* 11:49-58.
- Saeed S, Barozai MYK. (2012). A review on genetic diversity of wild plants by using different genetic markers. *Pure Applied Biol.* 1:68-71.
- Santoso TJ, Utami DW, Septiningsih EM. (2006) Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *J AgroBiogen.* 2:1-7.

- Shaw PC, Wong KL, Chan AWK, Wong WC, But PPH. (2009). Patent applications for using DNA technologies to authenticate medicinal herbal material. *Chinese Med J.* 4, 21.
- Singh RK, Bhat KV, Bhatia VS, Mohapatra V. (2010). SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity. *Genet Mol Biol.* 33:319-324.
- Song QJ. (1999). A review of development and application of simple sequence repeat (SSR) in soybean. *Soybean Sci.* 18:248-254.
- Song QJ, Quigley CV, Nelson RL, Carter TE, Boerma HR, Strachan JL, Cregan PB. (1999). A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. *Plant Varieties Seeds.* 12:207-220.
- Squirrel J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W. (2003). How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Mol Ecol.* 12:1339-1348.
- Tasma IM, Yani NPMG, Purwaningdyah R, Satyawan D, Nugroho K, Lestari P, Trijatmiko KR, Mastur. (2018) Genetic diversity analysis and F2 population development for breeding of long juvenile trait in soybean. *J AgroBiogen.* 14:11-22.
- Tasma IM, Satyawan D, Warsun A, Yunus M, Santosa B. (2011). Phylogenetic and maturity analyses of sixty soybean genotypes used for DNA marker development of early maturity quantitative trait loci in soybean. *J AgroBiogen.* 7:37-46.
- Tasma IM, Warsun A. (2009). Genetic diversity analysis of Aluminum-toxicity tolerant and sensitive soybean genotypes assessed with microsatellite markers. *J AgroBiogen.* 5:1-6.

- Tasma IM, Warsun A, Asadi. (2008). Development and characterization of F2 population for molecular Mapping of Aluminum-toxicity tolerant QTL in Soybean. *J AgroBiogen*. 4:1-8.
- Terryana RT, Nugroho K, Mulya K, Dewi N, Lestari P. (2017). Keragaman genotipik dan fenotipik 48 aksesori kedelai introduksi asal Cina. *J AgroBiogen*. 13:1-16.
- Thompson MJ. (2004) Microsatellite fragment sizing on the CEQ 8000. In: BB Biogen Standard Operating Procedure Series. Bogor (Indonesia): Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development. pp. 1-10.
- Thomson MJ, Septiningsih EM, Suwardjo F, Santoso TJ, Silitonga TS, McCouch SR. (2007). Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor Applied Genet*. 114:559-568.
- Vu DT, Baek KH, Tuan Nghia L, Park E. (2013). Characterizing morphological traits and estimating genetic relationship for intermediate soybean collected from South Korea. *Plant Breed*. 132:324-329.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G. (2005). DNA Fingerprinting in Plant: Principles, Methods, and Application. 2nd Ed. New York (USA): CRC Press.
- Xie H, Chang RZ, Cao YZ, Zhang MH, Feng ZF, Qiu LJ. (2003). Selection of core SSR loci by using Chinese autumn soybean. *Sci Agric Sinica*. 36:360-366.
- Wang B, Chang RZ, Yan L, Tao L, Guan RX, Zhang MH, Feng ZF, Qiu LJ. (2003). Identification of SSR primer numbers for

analyzing genetic diversity of Chinese cultivated soybean Mol Plant Breed. 1:82-88.

Yanagisawa T, Hayashi M, Hirai A, Harada K. (1994). DNA fingerprinting in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) with oligonucleotide probes for simple repetitive sequences. Euphytica. 80:129-136.

Yoon MS, Lee J, Kim CY, Kang JH, Cho EG, Baek HJ. (2009). DNA profiling and genetic diversity of Korean soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) landraces by SSR markers. Euphytica. 165:69-77.

Zhang L, Cai R, Yuan M, Tao A, Xu J, Lin L, Fang P, Qi J. (2015). Genetic diversity and DNA fingerprinting in jute (*Corchorus* spp.) based on SSR markers. Crop J. 3:416-422.

