

## ANALISIS KERAGAMAN GENETIK PLASMA NUTFAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) BERDASARKAN MARKA SSR

SURTI KURNIASIH<sup>1)</sup>, RUBIYO<sup>2)</sup>, ASEP SETIAWAN<sup>3)</sup>, AGUS PURWANTARA<sup>4)</sup>, dan SUDARSONO<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Pakuan,  
Jl. Pakuan PO Box 452, Bogor,  
email: kurniasihurti@yahoo.com

<sup>2)</sup> Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Jl. Tentara Pelajar No. 1 Bogor

<sup>3)</sup> Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor,  
Jl. Meranti-Kampus IPB Darmaga, Bogor

<sup>4)</sup> Lembaga Riset Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana, Bogor

(Diterima Tgl. 1 - 6 - 2011 - Disetujui Tgl. 28 - 10 - 2011)

### ABSTRAK

Marka mikrosatelit atau sekuens sederhana berulang (*simple sequence repeat* = SSR) terbukti merupakan alat yang bagus untuk identifikasi kultivar, analisis pedigree, dan evaluasi jarak genetik berbagai organisme. Penelitian ini bertujuan untuk: 1) karakterisasi kakao koleksi Pusat penelitian Kopi dan Kakao Indonesia menggunakan marka SSR dan 2) analisis keragaman genetik klon-klon kakao koleksi dengan menggunakan marka SSR. Dalam penelitian ini, 39 pasangan primer SSR telah digunakan untuk amplifikasi DNA genomik dari 29 klon kakao. Skoring pita SSR hasil amplifikasi menggunakan masing-masing pasangan primer dilakukan secara terpisah dan digunakan untuk menentukan jarak genetik di antara klon kakao yang dievaluasi. Hasil percobaan menunjukkan bahwa semua pasangan primer SSR yang digunakan mampu menghasilkan pita DNA hasil amplifikasi (marka SSR) untuk 29 klon kakao yang diuji. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa 34 dari 39 lokus SSR yang dianalisis bersifat polimorfik sedangkan lima primer yang lain bersifat monomorfik. Dari 29 klon kakao yang dievaluasi, telah berhasil diamplifikasi sebanyak 132 alel, dengan kisaran antara 4-8 alel/lokus. Rataan jumlah alel per lokus sebanyak 5,50. Hasil analisis data yang dilakukan juga menunjukkan nilai PIC untuk marka SSR yang digunakan sebesar 0,665. Untuk populasi klon kakao yang dievaluasi, diperoleh nilai rata-rata heterosigositas pengamatan ( $H_o$ ) sebesar 0,651 dan rata-rata diversitas gen ( $H_e$ ) sebesar 0,720. Nilai PIC  $H_o$  dan  $H_e$  yang didapat tergolong tinggi. Berdasarkan analisis keragaman dengan menggunakan program NTSys, diperoleh hasil 12 klon kakao berada dalam grup pertama (koefisien keragaman < 3,75) dan 9 klon berada dalam grup kedua, dengan koefisien keragaman < 7,50. Sedangkan klon-klon lainnya mempunyai koefisien keragaman > 7,50. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data disimpulkan bahwa marka SSR dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik plasma nutfah kakao. Tingkat polimorfisme yang dihasilkan marka SSR relatif tinggi. Tingkat heterosigositas plasma nutfah kakao koleksi Puslit Kopi dan Kakao Indonesia relatif tinggi, dan keragaman genetiknya cukup tinggi.

Kata kunci : *Theobroma cacao* L, mikrosatelit, marka molekuler, keragaman genetik, heterosigositas

### ABSTRACT

#### *Analysis of Genetic Variability Germplasm of Cacao (Theobroma cacao L.) Based on SSR Marker*

Microsatellite or simple sequence repeat (SSR) markers have proven to be an excellent tool for cultivar identification, pedigree analysis, and genetic distance evaluations among organisms. The objectives of this research were to characterize cacao collection of Indonesian Coffee and

Cacao Research Institute (ICCRI) and to analyze their genetic diversity using SSR markers. In this research, 39 SSR primer pairs were used to amplify genomic DNA of 29 cacao clones. Amplified SSR fragments for each primer pair were scored as individual band and used to determine genetic distance among evaluated cacao clones. Results of the experiment indicated that all SSR primer pairs evaluated were able to produce SSR markers for 29 cacao clones. The results also indicated that 34 out of 39 microsatellite loci evaluated were polymorphic, while 5 others were monomorphic. The total number of observed alleles among 29 clones was 132. Number of alleles per locus ranged from 4-8, with an average of 5.5 alleles per locus. Results of data analysis indicated that the PIC value was 0.665, the observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.651, and the gene diversity ( $H_e$ ) was 0.720. The PIC,  $H_o$ , and  $H_e$  values were considered high. Genetic distances were evaluated using NTSys version 2.1 and dendrogram was constructed. Results of analysis indicated that 12 cacao clones evaluated were clustered in the first group with diversity coefficient of < 3.75. Nine cacao clones were in the second group but with the same value of diversity coefficient (< 7.50). The rest of the cacao clones were in the third group with diversity coefficient of > 7.50. Based on those finding, all SSR primer pairs evaluated could be used to analyze cacao genome and be useful for genetic diversity analysis of cacao germplasm. The SSR marker analysis in ICCRI cacao collections resulted in high PIC, high observed heterozygosity, and high genetic diversity.

Key words : *Theobroma cacao* L, microsatellite, molecular marker, genetic diversity, heterozygosity

### PENDAHULUAN

Kakao merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang telah lama dibudidayakan baik oleh masyarakat maupun perusahaan perkebunan yang dikelola oleh pemerintah. Hal ini disebabkan karena hingga saat ini berbagai produk pangan yang berbahan biji kakao sangat digemari oleh semua lapisan masyarakat. Oleh karena itu permintaan pasar akan tanaman ini terus meningkat dari waktu ke waktu seiring dengan peningkatan pertumbuhan penduduk, baik untuk pasar dalam negeri maupun ekspor ke berbagai negara yang merupakan produsen makanan berbahan dasar kakao. Untuk itu maka Indonesia sebagai salah satu produsen perlu memanfaatkan peluang tersebut untuk meningkatkan devisa negara dengan meningkatkan ekspor biji kakao.

Kakao memiliki potensi yang amat besar untuk dikembangkan menjadi komoditas ekspor andalan Indonesia, sehingga budidaya tanaman ini perlu terus ditingkatkan. Untuk itu maka diperlukan tersedianya bibit dan benih kakao yang unggul dan bermutu, sehingga diperlukan pengembangan kultivar kakao yang unggul. Salah satu upaya yang telah dikembangkan oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao untuk mendapatkan kultivar kakao unggul adalah dengan menggunakan benih hibrida F1. Untuk menghasilkan hibrida F1 unggul yang berproduksi tinggi dan resisten terhadap serangan penyakit busuk buah kakao akibat infeksi *Phytophthora palmivora* perlu digunakan tetua donor yang mempunyai sifat resisten dan tetua penerima yang mempunyai daya hasil tinggi. Untuk mendapatkan tetua tersebut diperlukan identifikasi dan analisis keragaman plasma nutfah kakao dari berbagai sentra produksi kakao di Indonesia.

Analisis keragaman genetik tanaman dapat dilakukan secara morfologi dengan pengamatan langsung terhadap fenotipe maupun dengan menggunakan marka molekuler. Penggunaan marka molekuler memiliki beberapa keuntungan dalam membantu pemuliaan, karena dapat digunakan untuk (1) analisis pautan dan pemetaan genetik, (2) identifikasi genotipe, (3) menduga keragaman genetik dan kekerabatan inter dan intra spesies atau varietas dan juga dapat membantu menjelaskan filogenetiknya (WEISING *et al.*, 1995). Dengan menggunakan marka molekuler, keragaman genetik plasma nutfah kakao sebagai calon tetua yang akan digunakan dalam program pemuliaan tanaman akan dapat ditentukan. Untuk meningkatkan kemungkinan diduplikasinya kultivar unggul baru, perlu dilakukan persilangan antar dua tetua yang mempunyai jarak genetik yang tinggi. Identitas tetua dengan jarak genetik yang tinggi dapat diketahui dengan menggunakan marka molekuler, sehingga metode ini dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi dalam program pemuliaan.

Berbagai jenis marka molekuler telah digunakan untuk karakterisasi dan analisis keragaman, serta pemetaan genetik kakao (LANAUD *et al.*, 1999). Pengembangan marka seleksi untuk program pemuliaan tanaman kakao telah mulai dilakukan oleh SCHNELL *et al.* (2007), sementara keragaman genetik kakao dengan menggunakan marka SSR telah dilakukan oleh ZANG *et al.* (2006). Selain itu, beberapa penelitian untuk mempelajari gen-gen ketahanan kakao terhadap *P. palmivora* juga telah dilakukan oleh CLEMENT *et al.* (2003) dan LANAUD *et al.* (2004).

SSR yang dikenal juga sebagai mikrosatelit, tersusun atas dua sampai enam DNA seperti (AT)<sub>n</sub>, (AGC)<sub>n</sub>, atau (GACA)<sub>n</sub> yang tersebar pada genom makhluk hidup eukariotik. Variasi alel pada lokus mikrosatelit dengan mudah dapat diperoleh dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik. Mikrosatelit telah digunakan secara luas pada berbagai jenis tanaman karena tingkat polimorfisme yang tinggi, lokus yang spesifik, mudah diperbanyak, hanya membutuhkan sedikit DNA, dan yang terpenting adalah sifatnya yang kodominan (PUGH *et al.*, 2004). Akan tetapi penggunaan marka ini membutuhkan dana dan waktu yang lebih banyak.

Pemanfaatan marka SSR untuk mengidentifikasi keragaman genetik telah banyak dilakukan pada berbagai jenis tanaman baik tanaman monokotil maupun dikotil. FREEMAN *et al.* (2004) menggunakan marka SSR untuk menentukan keragaman pada tanaman teh, PRIOLLI *et al.* (2002) pada kedelai, KACAR *et al.* (2005) pada chery, SOLODENKO and YU (2005) pada helianthus, KUMAR *et al.* (2011) pada kelapa serta masih banyak komoditas lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa dengan berbagai kelebihan yang dimiliki, marka SSR sangat potensial untuk dikembangkan sebagai marka molekuler terutama untuk keperluan identifikasi dan studi keragaman genetik.

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) karakterisasi kakao koleksi Puslit Kopi dan Kakao Indonesia menggunakan marka SSR dan 2) analisis keragaman genetik klon-klon kakao koleksi Puslit Kopi dan Kakao Indonesia dengan menggunakan marka SSR.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di laboratorium "Biodiversity and Conservation," Center of Agricultural Biotechnology (CAB), Kasetsart University, Thailand dan di Laboratorium Biologi Molekuler Tanaman (PMB Lab.), Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB) mulai bulan Juli 2008 sampai dengan Januari 2009.

### Bahan Tanaman dan Ekstraksi DNA Kakao

Seluruh bahan tanaman yang berupa 29 klon kakao diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jember (Tabel 1). Untuk analisis, lebih kurang 20-30 mg daun kering dari masing-masing klon dipotong kecil-kecil dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* bersama bola gir kecil. Sampel daun dihancurkan dalam mesin penghancur jaringan (Retsch MM301) selama 3 menit dengan frekuensi 300 hertz. Jaringan yang sudah hancur diinkubasi dengan buffer lisis yang mengandung RNase selama semalam, dan difiltrasi melalui filter column. Ekstraksi larutan DNA selanjutnya dilakukan sesuai dengan protokol *Plant Genomic DNA Mini Kit*.

### PCR dan Analisis SSR

Template DNA dari masing-masing klon kakao diuji dengan 39 primer SSR yang telah dikembangkan oleh LANAUD *et al.* (1999) dan PUGH *et al.* (2004) dan telah didesain ulang urutan nukleotidanya dengan menggunakan program primer 3 (Tabel 2). PCR dilakukan dengan total volume 15 µl, terdiri atas 2 µl DNA template, 1 µl primer, 1,5 µl 10x buffer, 0,15 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,075 Taq DNA polymerase, dan 2,7 µl dNTP.

Tabel 1. Daftar nama klon, tipe, dan kelompok kakao yang digunakan dalam penelitian

Table 1. Name of cacao clones, types, and groups used in the experiment

No.	Nama klon Clone Name	Tipe kakao Cacao Type	Kelompok kakao Cacao groups
1.	PA 300	Forastero	Lindak
2.	PA 303	Forastero	Lindak
3.	DR 1	Trinitario	Mulia
4.	DR 2	Trinitario	Mulia
5.	DR 38	Trinitario	Mulia
6.	ICCRI 1	Trinitario	Lindak
7.	ICCRI 2	Trinitario	Lindak
8.	ICCRI 3	Trinitario	Lindak
9.	ICCRI 4	Trinitario	Lindak
10.	DRC 15	Trinitario	Lindak
11.	DRC 16	Trinitario	Mulia
12.	RCC 70	Forastero	Lindak
13.	RCC 71	Forastero	Lindak
14.	RCC72	Forastero	Lindak
15.	RCC 78	Forastero	Lindak
16.	SCa 6	Forastero	Lindak
17.	SCa12	Forastero	Lindak
18.	SCa89	Forastero	Lindak
19.	NIC 4	Forastero	Lindak
20.	NIC 7	Forastero	Lindak
21.	ICS 13	Trinitario	Lindak
22.	ICS 60	Trinitario	Lindak
23.	GC 7	Trinitario	Lindak
24.	KEE 2	Forastero	Lindak
25.	UIT 1	Forastero	Lindak
26.	TSH 858	Trinitario	Lindak
27.	TSH 908	Trinitario	Lindak
28.	UF 667	Forastero	Lindak
29.	NW 6261	Forastero	Lindak

Keterangan : Data tipe dan kelompok kakao diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia

Note : Data of cacao type and group were obtained from Indonesian Coffee and Cacao Research Institute (ICCRI)

Proses PCR dilakukan dengan 39 siklus, diawali denaturasi pada 94°C selama 4 menit, kemudian 39 siklus berikutnya yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 45 detik, penempelan (*annealing*) pada suhu 55°C selama 45 detik, dan perpanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 30 detik. Tahap terakhir dilanjutkan dengan perpanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit dan pendinginan (*cooling*) sampai suhu 16°C selama 5 menit.

Hasil amplifikasi PCR dievaluasi dengan gel agarose 1% selama 20 menit pada mesin elektroforesis dengan arus 300 Am dan 200 V. Selanjutnya, PCR produk dielektroforesis pada gel akrilamid (4,5% polyacrilamide gel, dengan perbandingan 19:1 antara acrylamide dengan bis acrylamide) dengan 1x TBE pada 300 V selama 2,5 jam, dan dilanjutkan dengan pewarnaan perak nitrat untuk menampakkan pita yang dihasilkan.

## Skoring dan Analisis Data

Skoring dilakukan terhadap ada tidaknya alel hasil amplifikasi PCR untuk masing-masing genotipe. Hasil skoring dilakukan analisis untuk melihat keragaman genetik dengan menggunakan software NTSys, sedangkan tingkat heterosigositas ditentukan dengan menggunakan software CERVUS.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Analisis SSR

Berdasarkan hasil seleksi primer, seluruh primer dapat menghasilkan produk PCR. Hal ini nampak dari hasil running pada gel agarose (Gambar 1). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan 39 primer yang sebelumnya telah digunakan oleh LANAUD *et al.* (1999); PUGH *et al.* (2004). Seluruh 39 lokus tersebut diharapkan dapat merepresentasikan lokus-lokus yang terdapat pada sepuluh kromosom (LG) kakao, masing-masing LG diambil empat lokus, kecuali nomor 7 hanya diambil tiga lokus. Berdasarkan hasil evaluasi dengan *running* di gel akrilamid, 29 lokus yang menghasilkan pita polimorfik dan hanya 24 yang berhasil diskoring. Sedangkan yang lainnya tidak dapat diskoring karena pita yang nampak *smear*. Dari sepuluh lokus yang lain, lima diantaranya menghasilkan pita monomorfik sedangkan lima lainnya tidak terdeteksi.

Identifikasi dan analisis keragaman genetik pada plasma nutfah kakao telah dilakukan dengan pengamatan morfologi (MOTILAL dan BUTLER, 2003; BEKELE *et al.*, 2006), akan tetapi hasilnya masih kurang sempurna karena karakter morfologi dapat berubah dan sangat dipengaruhi musim. Analisis molekuler dapat membantu mengatasi kekurangan tersebut. Penggunaan marka molekuler mikrosatelit (SSR) telah dilakukan pada tanaman kakao untuk berbagai tujuan, seperti karakterisasi dan analisis keragaman genetik (LANAUD *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2006), karakterisasi kakao koleksi internasional (ZHANG *et al.*, 2009), dan pembuatan *linkage map* (RISTERUCCI *et al.*, 2000; PUGH *et al.*, 2004). Meskipun primer yang digunakan dalam penelitian ini merupakan primer yang telah digunakan sebelumnya, akan tetapi beberapa lokus tidak menghasilkan pita yang jelas sehingga tidak dapat diskoring. Hal ini diduga karena urutan basa pada beberapa lokus tersebut tidak dapat mengamplifikasi genom kakao dari sampel yang digunakan. Pita polimorfik yang dihasilkan pada 24 lokus menunjukkan adanya keragaman di antara sampel kakao yang dianalisis. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan marka SSR cukup efektif untuk mempelajari keragaman genetik plasma nutfah kakao (SAUNDERS *et al.*, 2004).

SURTI KURNIASIH *et al.*: Analisis keragaman genetik plasma nutfah kakao (*Theobroma cacao L.*) berdasarkan marka SSR

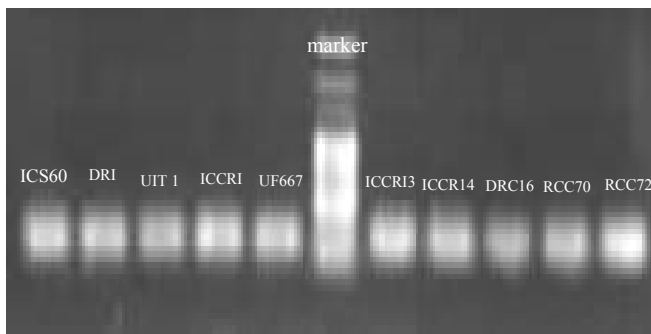
Tabel 2. Nama lokus, urutan basa nukleotida, jumlah oligonukleotida pada primer dan ukuran produk amplifikasi, motif ulangan, dan suhu penempelan dari 39 primer SSR yang digunakan dalam penelitian

Table 2. Locus names, nucleotide sequences, number of oligonucleotide primer, size of amplified product, repeat motifs, and annealing temperature of the 39 SSR primers used in this research

No	LG	Nama lokus Locus name	Urutan Basa Order of bases	Jumlah basa Number of bases	Ukuran alel Size of allele (bp)	Repeat Sekuens Sequence repetition	Tm (°C)
1	1	mTeCIR144	F: AACCACTGACACGCAATGAA R: TGTTTGGCAAATAAAGAAGAGAGGA	20 24	242	(CT)2TTT(CT)9	60,16 59,45
2	1	mTeCIR138	F: GGCACCTGCCAAGTCAAGTA R: AATGCTTGATTTTCAAACACATT	20 24	162	(CA)11	61,24 59,01
3	1	mTeCIR184	F: ACTGCTGCAGCCTCTCTTTC R: ACATGGAGGGAGGGAGAGAT	20 20	204	(CA)8(CT)13	59,90 59,89
4	1	mTeCIR264	F: CGGTGAGGAAGACAAGAGGA R: TCATTGACAGTGAGCATCAGG	20 21	225	(CT)8	60,38 59,85
5	2	mTeCIR162	F: GACCTTTTCCCCTGATTC R: TGGCAAAAATTCACCAGTCA	20 20	250	(GA)19	59,74 60,09
6	2	mTeCIR141	F: TTGGAGTTCAAGGTGTGGTG R: GCCGCTAGCTTTCCTCTTTC	20 20	239	(CT)14	59,57 60,60
7	2	mTeCIR268	F: ACAGAGAGTGAGCGAGCA R: CACTGTGTGGGACGACATT	18 20	212	(GA)17GG(GA)9	59,92 59,44
8	2	mTeCIR281	F: AATTGATTCCGCTGTTTTGG R: GAAAAGGATGAGGGGTGGTT	20 20	209	(TC)12(CA)14	59,94 60,17
9	3	mTeCIR82	F: GCAATCATGTGCCCTTCTA R: AAGCTTATTGCGGAAGGACA	20 20	206	(AG)6AA (AG)7	61,00 59,85
10	3	mTeCIR81	F: GTCATGCACGTTGAACCAGA R: TGGAAAATGGTAGGGCATTC	20 20	188	(CT)15	60,73 59,76
11	3	mTeCIR167	F: AATCGGTGCATGGTAGAACC R: AGCATAGTGTGCTTCTGTGTC	20 22	244	(GA)18	59,82 59,45
12	3	mTeCIR198	F: GGGACCATAAGGAAATCATGC R: GCTTGCCAGGTGAAGTAAG	21 20	192	(CA)3TA(CA)6	60,53 59,88
13	4	mTeCIR95	F: GTTCTGCACATGGGCTCTA R: TGCAATGGATGCTGAAACAAG	20 20	237	(TC)4CC(TC)21	60,22 60,81
14	4	mTeCIR76	F: GAAAATGGGGTCTTTTGGT R: AGGCGAAGAGGAGAAGAAG	20 20	196	(CT)9	60,03 60,09
15	4	mTeCIR213	F: TCCAATGTTGATCTCGCAA R: TTTTCATTCTGCTTGCGTA	20 20	186	(CT)26	60,20 59,44
16	4	mTeCIR67	F: GGTTCTCGCTTGAAAATCCA R: CCTCTTTCCAAGCCTCCAT	20 20	176	(CT)7(CA)12	60,19 60,57
17	5	mTeCIR69	F: GGACATCGGTGTCCATCAG R: TGCTATGAGATTGAAAGAGAATTGA	20 25	208	(CT)20	61,36 59,43
18	5	mTeCIR109	F: CCCGTAAGCTTCCATTTTCC R: CAAAGGGACCAAAAAGAGCA	20 20	221	(CT)12	60,79 60,22
19	5	mTeCIR106	F: GGGAGTTAAAATGGGGCAAG R: TTGCTGTGTGTGCTTGTCTTT	20 22	246	(GA)9TTG(CA)3	60,66 59,96
20	5	mTeCIR10	F: CGAATTGACAGATGGCTACA R: CCCAAGCAAGCCTCATACTC	21 20	122	(TG)13	61,04 59,84
21	6	mTeCIR16	F: CTTACCAGCTCACCGATCT R: ATCAATGGGTTGCGGTAGTG	20 20	207	(CT)13	60,41 59,67
22	6	mTeCIR255	F: GCCTTACAGCATTCCCATGA R: ATCTGCAGGACTTGGACCAC	20 20	193	(AC)11	61,00 60,12
23	6	mTeCIR276	F: TGTGTGTTTAATTGCTCTGCT R: TGTCTGCCCTTGGACCTTTC	22 20	199	(GA)14	59,81 60,23
24	6	mTeCIR291	F: TTGCAATTGTCCCAAGCATA R: ATGTCAAGCATGGCAGTGTT	20 20	212	(CT)12	60,07 59,17
25	7	mTeCIR186	F: GCGTGTGTGTGCAAAATGATA R: CCGATAAATGGGCGTTGTAG	20 20	155	(TG)8	59,15 60,34
26	7	mTeCIR190	F: CTGAAGCACAAATTATCCATCAA R: CCAATTGCTCCACAAAAGAGC	23 20	172	(TG)12	59,13 60,78
27	7	mTeCIR7	F: GCTTTCAGTCCTTTGCTTCA R: CAGACAAGCCATGGTCAGTG	21 20	122	(CT)14	59,62 60,31
28	8	mTeCIR99	F: TTCGGAAATGTCGAGAGAGG R: CCTCTGCCCATGATCCTATG	20 20	167	(GA)9	60,33 60,44
29	8	mTeCIR103	F: CTCCAAGAAAAGAGGCACA R: TTGTGGTTATTGCGAACGTG	20 20	175	(GA)10	58,08 60,56
30	8	mTeCIR211	F: GGGATTGCACCTTCAAAAGGT R: TCCAAGTCCGTATGTGCTG	20 20	179	(CT)9	59,97 59,72
31	8	mTeCIR218	F: CATGCGTTGACCAAGGAAG R: ATCAATGCATGGGAACACCT	19 20	181	(CT)11	60,25 60,20
32	9	mTeCIR90	F: CCAGTTCAAAAATCATGTTACGTG R: TTGTGGAGCAACTGTCAACC	24 20	155	(CT)10	60,78 59,73

Tabel 2. (... Lanjutan)  
Table 2. (... Continued)

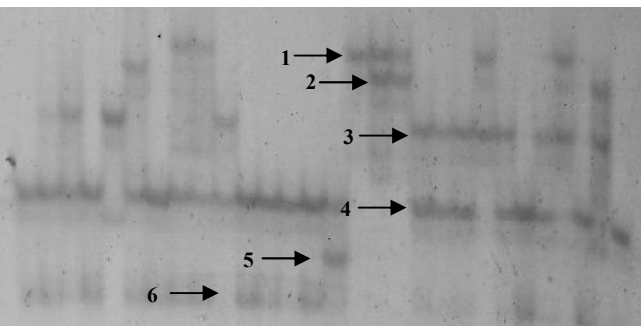
No	LG	Nama lokus <i>Locus name</i>	Urutan Basa <i>Base sequence</i>	Jumlah Basa <i>Number of bases</i>	Ukuran alel <i>Allele size</i> (bp)	Repeat Sekuens <i>Sequence repeat</i>	Tm (°C)
33	9	mTcCIR145	F: TGGAAGGCTGTCCAAAATTC	20	241	(CT)17	60,05
			R: TGTITGTGCTGGCTTTTGC	20			59,89
34	9	mTcCIR251	F: TCATGCCAGTGACACAAAT	20	228	(CT)7(CA)12	59,97
			R: AATGGACTGGAGCATGGAAG	20			60,07
35	9	mTcCIR287	F: GCGTTGTCTCGCTTTCTTCT	20	160	(TC)9	59,76
			R: GGGAAAGCCATGTTTCATGTT	20			59,80
36	10	mTcCIR91	F: GCCCATGCTTCTTTCATGT	20	191	(CT)10	60,23
			R: GGGAAATGAGAAGGGTGTGA	20			59,90
37	10	mTcCIR155	F: CTTAGAGGCTTGCCGCTGA	20	197	(TC)12	61,50
			R: GCCATGCCAATTTCCAATAA	20			60,65
38	10	mTcCIR209	F: TGTCCCTCACATAAGCCATGA	21	243	(GT)6AT(GA)9	59,14
			R: TGTGCCCTTCCTTTGTTAGG	20			60,10
39	10	mTcCIR229	F: TCTGGCCCTTGAGAATGAGT	20	151	(TC)8	59,80
			R: TCCGAATCCTACAACACAA	20			60,11



Gambar 1. Contoh hasil PCR dengan mTcCIR155 pada gel agarose  
Figure 1. Agarose gel of PCR product with mTcCIR locus

**Analisis Keragaman Genetik**

Seperti telah diuraikan di atas, 24 lokus SSR menunjukkan pita polymorfik dan telah berhasil diskoring dan dianalisis (Gambar 2). Berdasarkan hasil analisis diperoleh total jumlah alel sebanyak 132 dari 24 lokus, dengan rata-rata jumlah alel per lokus 5,50. Jumlah alel



Gambar 2. Contoh hasil gel akrilamid yang menunjukkan polimorfisme 29 klon kakao pada primer MTcCIR 211  
Figure 2. Acrylamide gel showing microsatellite marker polymorphism among 29 cacao clones with MTcCIR 211

terkecil sebanyak 4 pada beberapa lokus dan terbesar sebanyak 8 pada lokus mTcCIR 155. Rata-rata jumlah alel per lokus lebih kecil dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh ZANG *et al.* (2009) yaitu 14,2 alel/lokus. Di antara 24 lokus yang digunakan dalam penelitian ini, sebanyak 15 lokus yang sama digunakan ZHANG *et al.* (2009) menghasilkan rata-rata jumlah alel per lokus 5,70 pada populasi *semi natural* dari Rio Ucayali Peru, dan 3,68 pada populasi Rio Huallaya. Sementara itu dengan menggunakan 11 lokus SSR, SERENO *et al.* (2006) melaporkan rata-rata jumlah alel 4,45 dari 94 aksesori yang mewakili 14 populasi di wilayah Amazon. Rendahnya rata-rata jumlah alel yang diperoleh pada penelitian ini diduga karena jumlah aksesori yang digunakan hanya 29 sedangkan ZHANG *et al.* (2009) menggunakan 688 aksesori.

Berdasarkan hasil analisis diperoleh rata-rata gen diversity (He) 0,720 dan rata-rata heterosigositas (Ho) sebesar 0,651. Keragaman genetik tertinggi 0,831 dihasilkan pada lokus mTcCIR 144, sedangkan terendah 0,540 pada mTcCIR 82. Heterosigositas tertinggi 0,964 pada lokus mTcCIR 218 dan mTcCIR 95, sedangkan yang terendah 0,250 pada lokus mTcCIR 190. Rata-rata Poymorphic Information Content (PIC) sebesar 0,665 (Tabel 3). Tingkat heterosigositas dan keragaman genetik yang cukup tinggi menunjukkan bahwa lokus SSR yang digunakan dapat membedakan klon-klon yang dianalisis. Setelah dikembangkannya marka SSR untuk kakao oleh LANAUD *et al.* 1999), maka identifikasi dan karakterisasi plasma nutfah kakao berkembang cukup signifikan (ZHANG *et al.*, 2009).

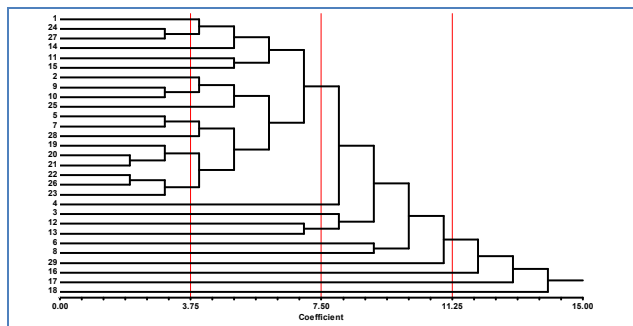
Analisis data hasil skoring dilakukan dengan menggunakan program NTSys untuk menentukan keragaman genetik. Berdasarkan analisis menggunakan program NTSys, diperoleh hasil 19 klon kakao berada dalam satu grup dengan koefisien keragaman di bawah 7,50, yaitu: PA 300, KEE 2, TSH908, RCC72, DRC16, RCC78, PA303, ICCRI4, DRC15, UIT1, DR38, ICCRI2, UF667, NIC4, NIC7, ICS13, ICS60, TSH858, GC7, dan DR2. Grup lain

yang juga memiliki koefisien keragaman di bawah 7,50, yaitu: DR1, RCC70, dan RCC71. ICCR11 dan ICCR13 mempunyai koefisien keragaman di atas 7,50. SCA6, SCA12, dan SCA89 mempunyai koefisien keragaman di atas 11,25 (Gambar 3).

Tabel 3. Parameter keragaman genetik 29 klon kakao berdasarkan marka SSR

Table 3. Details of variability parameters generated among 29 cacao clones based on SSR marker

Lokus <i>Locus</i>	Jumlah alel <i>Number of allele</i>	Parameter keragaman <i>Variability parameters</i>		
		Ho	He	PIC
mTeCIR 213	6	0,759	0,802	0,757
mTeCIR 198	4	0,379	0,693	0,623
mTeCIR 82	4	0,630	0,540	0,471
mTeCIR 16	5	0,793	0,759	0,700
mTeCIR 209	6	0,407	0,798	0,749
mTeCIR 218	4	0,964	0,679	0,606
mTeCIR 255	7	0,643	0,605	0,542
mTeCIR 190	6	0,250	0,727	0,681
mTeCIR 276	5	0,357	0,779	0,729
mTeCIR 167	4	0,393	0,666	0,601
mTeCIR 291	6	0,556	0,760	0,712
mTeCIR 211	6	0,862	0,751	0,701
mTeCIR 10	4	0,577	0,608	0,513
mTeCIR 144	7	0,714	0,831	0,791
mTeCIR 251	5	0,808	0,689	0,624
mTeCIR 184	7	0,960	0,826	0,783
mTeCIR 91	4	0,310	0,603	0,536
mTeCIR 155	8	0,962	0,817	0,775
mTeCIR 162	4	0,552	0,673	0,613
mTeCIR 76	6	0,889	0,767	0,713
mTeCIR 109	7	0,821	0,799	0,752
mTeCIR 95	7	0,964	0,822	0,780
mTeCIR 67	5	0,414	0,607	0,566
mTeCIR 69	5	0,593	0,681	0,633
Mean	5,50	0,651	0,720	0,665



Gambar 3. Dendrogram hasil clustering 29 klon kakao dengan marka SSR  
Figure 3. Dendrogram of 29 cacao clones based on 24 SSR markers

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data diperoleh kesimpulan bahwa marka SSR dapat digunakan untuk evaluasi keragaman genetik plasma nutfah kakao dengan tingkat polimorfisme yang cukup tinggi. Tingkat

heterosigositas dan keragaman genetik plasma nutfah kakao koleksi Puslit Kopi dan Kakao Indonesia yang relatif tinggi memiliki peluang yang amat potensial untuk dijadikan sebagai tetua dalam persilangan, untuk mendapatkan hibrida yang unggul dan bermutu.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Naskah ini merupakan pengembangan salah satu bagian dari disertasi penulis. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada pemerintah Indonesia melalui Ditjen Dikti yang telah memberikan dukungan dana sehingga penulis dapat menempuh pendidikan S3 di IPB. Terima kasih juga disampaikan kepada Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang telah menyediakan sampel kakao, laboratorium "Biodiversity and Conservation", Central of Agricultural Biotechnology Kasetsart University Thailand, yang telah menyediakan fasilitas untuk penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Hugo Volckaert atas bimbingan dan arahannya selama penulis melaksanakan penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

BEKELE, F., I. BEKELE, D. BUTLER, and G. BIDAI SEE. 2006. Patterns of morphological variation in a sample of cacao (*Theobroma cacao L.*) germplasm from the International Cocoa Genebank, Trinidad. *Genet Resour Crop Evol.* 53:933-948.

CLEMENT, D., A.M. RISTERUCCI, L. GRIVET, J.C. MOTAMAYOR, J. N'GORAN, and C. LANAUD, 2003. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao L.* *Genome.* 46:204-212.

FREEMAN, S., J. WEST, C. JAMES, V. LEA, and S. MAYES. 2004. Isolation and Characterization of Highly Polymorphic Microsatellites in Tea (*Camellia sinensis*). *Mol. Ecol. Notes.* (4): 324-326.

KACAR, Y.A., A. LEZZONI, and S. CETINER. 2005. Sweetcherry Cultivar Identification by using SSR Markers. *J. of Bioscience.* p. 616-619.

KUMAR, S. PRADEP, R. MANIMEKALAI, and B.D.R. KUMARI. 2011. Microsatellite Marker based Characterization of South Pacific Coconut (*Cocos nucifera L.*) Accessions.

LANAUD, C., A.M. RISTERUCCI, I. PIERETTI, M. FALQUE, A. BOUET, and P.J.L. LAGODA. 1999. Isolation and characterization of microsatellites in *Theobroma cacao L.* *Mol. Ecol.* 8:2141-2143.

LANAUD, C., A.M. RISTERUCCI, I. PIERETTI, J.A.K. N'GORAN, and D. FARGEAS. 2004. Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in

- cocoa (*Theobroma cacao* L.). Molecular Breeding. 13:211-227.
- MOTILAL, L. and D. BUTLER. 2003. Verification of identities in global cacao germplasm collections. Genet. Resour. Crop. Evol. 50:799-807.
- PRIOLLI, RHG., C.T. MENDEZ., N.E. ARANTES, and E.P.B. CONTEL. 2002. Characterization of Brazilian Soybean Cultivars using Microsatellite Markers, Gen and Mal. Biology. (25.2): 185-193.
- PUGH, T., O. FOUET, M. RISTERUCCI, P. BROTTIER, M. ABOULADZE, C. DELETREZ, B. COURTOIS, D. CLEMENT, P. LARMANDE, J.A.K. N'GORAN, and C. LANAUD. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. Theor Appl Genet. 108:1151 - 1161.
- RISTERUCCI, A.M., L. GRIVET, J.A.K. N'GORAN, I. PIERETTI, M.H. FLAMENT, and C. LANAUD. 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor Appl. Genet. 101: 948-955.
- SAUNDERS, J.A., S. MISCHKE, E.A. LEANY, and A.A. HEMEIDA. 2004. Selection of International molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao* L. Theor. Appl. Genet. 110:41-47.
- SCHNELL, R.J., D.N. KUHN, J.S. BROWN, C.T. OLANO, W. PHILLIPS-MORA, F.M. AMORES, and J.C. MOTAMAYOR. 2007. Development of a Marker Assisted Selection Program for Cacao. Phytopathology. 12: 1664-1669.
- SERENO, M.L., P.S.B. ALBUQUERQUE, R. VENCOVSKY, and A. FIQUEIRA. 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao*) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite marker. Conserv. Genet. 7: 13-24.
- SOLODENKO, A. and S. YU. 2005. Genotyping of Helianthus-Based on Microsatellite Sequences. Helia. 28(42): 19-26.
- WEISING, K., H. NYBOM, K. WOLFF, and W. MEYER. 1995. DNA Fingerprinting in Plant and Fungi. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ZHANG, D. S. MISCHKE, R. GOENAGA, A.A. HEMEIDA, and J.A. SAUNDERS. 2006. Accuracy and Reliability of High-Throughput Microsatellite Genotyping for Cacao Clone Identification. Crop Sci. 46:2084-2092.
- ZHANG, D. S. MISCHKE, E. S. JOHNSON, W. PHILLIPS-MORA, and L. MEINHARDT. 2009. Molecular characterization of an international cacao collection using microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes 5:1-10.