

---

---

# PERAN MARKA MOLEKULER DALAM PERBAIKAN GENETIK TANAMAN KAKAO

## *THE ROLE OF MOLECULAR MARKERS FOR CACAO GENETIC IMPROVEMENT*

Nur Kholilatul Izzah

### BALAI PENELITIAN TANAMAN INDUSTRI DAN PENYEGAR

Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357

*lila\_ref@yahoo.co.id*

#### ABSTRAK

Tanaman kakao telah lama dibudidayakan di Indonesia karena memiliki potensi yang besar baik sebagai penghasil devisa negara maupun dari segi kegunaannya dalam berbagai produk pangan olahan. Peningkatan produktivitas kakao menjadi prioritas utama dalam rangka menunjang sektor industri yang berbahan dasar biji kakao. Salah satu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan produksi kakao adalah dengan merakit varietas baru yang mempunyai sifat produksi tinggi serta tahan terhadap hama dan penyakit utama. Perkembangan teknologi marka molekuler dapat digunakan untuk membantu para pemulia dalam mendapatkan varietas baru dengan sifat yang diinginkan. Hal ini karena marka molekuler merupakan salah satu alat untuk menganalisis genom suatu tanaman, yang dapat digunakan untuk mengetahui adanya keterkaitan antara sifat yang diwariskan dengan variasi genomnya. Dalam beberapa tahun terakhir, marka molekuler banyak digunakan dalam berbagai analisis genetik, seperti penilaian hubungan genetik antar individu, pemetaan gen, pembuatan peta genetik, identifikasi lokus sifat kuantitatif (QTL), *marker assisted selection* (MAS), dan studi filogenetik. Pada umumnya marka molekuler dapat dimanfaatkan pada tahap seleksi tanaman. Seleksi tanaman dengan bantuan marka memberikan hasil yang cukup meyakinkan karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan sehingga dapat disimpulkan bahwa marka molekuler dapat dipakai sebagai alat pendukung yang efektif dan efisien dalam program percepatan pemuliaan tanaman kakao.

**Kata kunci:** Kakao, marka molekuler, perbaikan genetik, program pemuliaan

#### ABSTRACT

*Cacao which has long been cultivated in Indonesia has great potential either as a foreign exchange sources as well as in terms of their typical role in a variety of processed food products. Increasing of cacao productivity becomes a major priority in order to support the industrial sector based of cocoa beans. One of the efforts to increase cacao production is to assemble new varieties that have high production and resistance to main pests and diseases. The development of molecular marker technology can be used by breeders to assist assembling of new varieties with desirable traits. This is due to molecular markers constitute one of the most powerful tools for plant genomes analysis, which allow the link between heritable traits with underlying genomic variation. Recently, molecular markers have been exploited for various genetic applications including assessment of genetic relationships between individuals, mapping genes, construction of linkage maps, identification of quantitative trait loci (QTL), marker assisted selections (MAS), and phylogenetic studies. Furthermore, molecular marker is known to be useful for plant selection. Plant selection with the aid of molecular markers provides reliable results because it is not influenced by the environmental factor. This suggests that molecular markers are an effective and efficient means to support the acceleration of cacao breeding programs.*

**Keywords:** *Cacao, molecular markers, genetic improvement, plant breeding program*

#### PENDAHULUAN

Pemuliaan tanaman pada umumnya bertujuan untuk meningkatkan sifat agronomis atau sifat unggul lainnya dengan menggabungkan karakter-karakter yang terdapat pada tetua yang berbeda, baik yang berasal dari spesies budidaya maupun dari kerabat liarnya (Winter & Kahl, 1995). Sampai saat ini kegiatan pemuliaan tanaman telah banyak menghasilkan varietas baru dengan sifat yang diinginkan. Meskipun untuk mendapatkan suatu varietas baru tersebut diperlukan waktu yang relatif cukup lama. Dalam upaya mendapatkan varietas baru, para pemulia menghadapi banyak tantangan seperti perubahan dalam sistem pertanian yang membutuhkan pengembangan genotipe tanaman

dengan karakteristik agronomis yang spesifik, kondisi lingkungan beserta organisme di dalamnya yang terus berubah, misalnya jamur dan hama serangga yang terus berkembang dan mampu mengatasi ketahanan tanaman inangnya, serta perubahan preferensi konsumen (Collard & Mackill, 2008).

Dalam upaya mendukung program pemuliaan, teknologi baru seperti bioteknologi sangat dibutuhkan untuk memaksimalkan keberhasilan perakitan suatu varietas tanaman (Ortiz, 1988 *cited in* Collard & Mackill, 2008). Bioteknologi adalah segala bentuk aplikasi teknologi yang menggunakan sistem biologi, yaitu organisme hidup atau turunannya untuk membuat atau memodifikasi produk atau proses (Sutrisno, 2006). Perkembangan bioteknologi di

beberapa negara maju telah dimulai sejak ditemukannya teknologi rekombinan DNA pada tahun 1980-an. Produk bioteknologi yang telah dihasilkan sampai saat ini adalah tanaman transgenik dan varietas unggul yang diperoleh melalui pemuliaan berdasarkan marka molekuler. Pemuliaan dengan menggunakan marka molekuler memiliki beberapa kelebihan dibandingkan produk transgenik, di antaranya: (1) tidak memerlukan pengujian keamanan hayati sebelum produk tersebut di pasarkan karena memerlukan waktu lama dan biaya besar (Bahagiawati, 2012), (2) teknologi marka molekuler memberikan harapan yang besar bagi perkembangan program pemuliaan tanaman karena dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan variasi alel di dalam gen yang mengkode suatu sifat (Collard & Mackill, 2008).

Marka molekuler adalah variasi dalam urutan DNA yang terdapat pada lokasi tertentu dalam suatu genom dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu individu atau spesies. Perkembangan marka molekuler diawali dengan munculnya marka biokimia seperti isozim, yang kemudian dengan cepat digantikan dengan marka berbasis DNA karena memberikan banyak keuntungan dibandingkan marka lainnya dalam studi genetika tanaman (Hendre & Aggarwal, 2007). Keuntungan marka berbasis DNA adalah dapat diwariskan, relatif mudah penggunaannya, dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan. Dalam beberapa tahun terakhir, hasil yang dicapai dalam perkembangan marka berbasis DNA telah meningkatkan pemahaman kita mengenai sumber daya genetik (Kalia, Rai, Kalia, Singh, & Dhawan, 2011).

Sampai saat ini metode pemuliaan yang biasa diterapkan pada tanaman kakao adalah metode pemuliaan konvensional, salah satu contohnya adalah metode seleksi berulang (*recurrent selection*) yang memerlukan waktu relatif lama. Penggunaan marka molekuler pada program pemuliaan kakao

diharapkan dapat diperoleh konfirmasi mengenai keunggulan genotipe tanaman secara lebih cepat dan akurat karena ekspresinya tidak dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tumbuh dan umur tanaman (Susilo, 2007) sehingga perakitan varietas unggul baru tanaman kakao dengan sifat yang diinginkan dapat dipercepat. Makalah ini menyajikan tentang tipe-tipe marka molekuler yang telah berkembang sampai saat ini dan peranannya dalam program pemuliaan tanaman kakao.

## KLASIFIKASI MARKA MOLEKULER

Marka molekuler dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori, yaitu (1) marka berdasarkan hibridisasi, yaitu *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), (2) marka berdasarkan *polymerase chain reaction* (PCR) seperti *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *inter simple sequence repeats* (ISSR) dan *microsatellite* atau *simple sequence repeats* (SSR), dan (3) marka berdasarkan sekuen, yaitu *single nucleotide polymorphism* (SNP). Marka-marka tersebut kebanyakan dikembangkan dari pustaka DNA genom (RFLP dan SSR) atau dari amplifikasi PCR acak dari DNA genom (RAPD) maupun berasal dari keduanya (AFLP) (Varshney, Thudi, Aggarwal, & Borner, 2007).

Setiap marka molekuler mempunyai kelebihan dan kekurangan masing-masing (Tabel 1). Oleh karena itu, pemilihan marka dalam analisis genetik perlu mempertimbangkan beberapa hal, antara lain tujuan analisis, sumber dana yang dimiliki, dan fasilitas yang tersedia (Pabendon, Azrai, Kasim, & Mejaya, 2007). Saat ini ada dua tipe marka yang paling sering digunakan dalam kegiatan analisis genetik tanaman kakao, yaitu *simple sequence repeat* (SSR) dan *single nucleotide polymorphism* (SNP). Deskripsi lengkap mengenai kedua marka tersebut disajikan di bawah ini.

Tabel 1. Karakteristik dari berbagai tipe marka molekuler  
*Table 1. Characteristics of various types of molecular markers*

Keterangan	Marka molekuler			
	EST-SSR	SSR	RFLP	RAPD/AFLP/ISSR
Kebutuhan untuk data sekuen	Penting	Penting	Tidak perlu	Tidak perlu
Tingkat polimorfisme	Rendah	Tinggi	Rendah	Rendah-Sedang
Sifat pewarisan	Kodominan	Kodominan	Kodominan	Dominan
Transferabilitas interspesifik	Tinggi	Rendah-Sedang	Sedang-Tinggi	Rendah-Sedang
Kegunaan dalam <i>marker-assisted selection</i>	Tinggi	Tinggi	Sedang	Rendah-Sedang
Biaya dan tenaga yang diperlukan dalam pengembangannya	Rendah	Tinggi	Tinggi	Rendah-Sedang

Sumber: Kalia *et al.* (2011)  
*Source: Kalia et al. (2011)*

### **Simple Sequence Repeat (SSR)**

SSRs, atau dikenal juga dengan mikrosatelit, adalah sekuen DNA bermotif pendek dengan panjang 1 sampai 6 pasangan basa yang diulang secara berurutan (Thiel, Michalek, Varshney, & Graner, 2003). Variasi panjang SSR terutama terjadi karena kesalahan pasangan rantai (*slippage strand mispairing*) pada saat replikasi DNA, dan mutasi semacam ini terjadi pada frekuensi lebih tinggi dibandingkan mutasi titik (*point mutations*) dan insersi/delesi (Pashley, Ellis, McCauley, & Burke, 2006). Marka SSR telah mendapatkan perhatian besar dalam studi analisis genetik karena mempunyai banyak kelebihan di antaranya adalah variabilitas tinggi, mempunyai alel banyak, kodominan, reproduktivitas tinggi, jumlah relatif melimpah, polimorfisme tinggi, mudah terdeteksi dengan metode PCR, cakupan genom yang luas (termasuk organellar genom), lokasi kromosom spesifik, dan *high throughput genotyping* (Parida, Yadava, & Mohapatra, 2010; Kalia *et al.*, 2014). Oleh karena itu, di antara bermacam-macam tipe marka berbasis PCR, SSR dipertimbangkan sebagai sistem marka yang lebih tepat untuk berbagai aplikasi pada analisis genetik tanaman maupun dalam program pemuliaan.

Berdasarkan pada sekuen yang digunakan untuk mengidentifikasi pengulangan sekuen DNA sederhana, SSR dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu genomik SSR dan *expressed sequence tags* (EST-SSR). Kedua tipe marka SSR ini telah banyak digunakan oleh para peneliti di seluruh dunia dalam kegiatan analisis genom tanaman. Akan tetapi, marka genomik SSR mempunyai beberapa kekurangan dibandingkan marka EST-SSR, yaitu (1) marka genomik SSR berasal dari pustaka genomik *bacterial artificial chromosome* (BAC), yang sebagian besar diperoleh dari daerah intergenik tanpa mempunyai fungsi gen, (2) prosedur pengembangan marka ini cukup sulit, kompleks, dan memerlukan biaya tinggi. Selain itu, transferabilitasnya terbatas karena hilangnya daerah pengulangan atau degenerasi dari tempat penempelan primer (Rungis *et al.*, 2004). Sementara, EST-SSR yang berasal dari daerah pengode (*coding regions*) bersifat lebih *conserved* sehingga marka ini dikenal mempunyai transferabilitas tinggi (Wei *et al.*, 2014). Sekuen EST adalah sekuen yang mempunyai panjang beberapa ratus pasang basa yang diperoleh dari 5' dan (atau) 3' *ends* sekuensing molekul *complementary* DNA (cDNA) yang disintesis dari sekuen messenger RNA (mRNA) (Adams, Soares, Kerlavage, Fields, & Venter, 1993). Dengan semakin berkembangnya teknologi sekuensing maka sejumlah besar sekuen EST yang berasal dari berbagai macam spesies tanaman saat ini telah tersedia di database publik. Ketersediaan sekuen EST pada database publik mengatasi kesulitan dalam pengembangan marka SSR secara konvensional karena marka SSR berbasis sekuen EST dapat dikembangkan dengan sederhana, cepat, dan berbiaya rendah. Marka EST-SSR ini sangat bermanfaat untuk pemetaan genetik, pemetaan komparatif serta analisis genetika dan keragaman fungsional (Yi, Lee, Lee, Choi, & Kim, 2006).

### **Single Nucleotide Polymorphism (SNP)**

SNP adalah perbedaan satu basa antara sekuen DNA dari individu-individu atau galur-galur yang dapat diuji dan dieksploitasi sebagai *high-throughput* marka molekuler (Trick, Long, Meng, & Bancroft, 2009). SNP ini dapat ditemukan di daerah pengode (*coding regions*) maupun di daerah yang tidak mengode (*non-coding regions*) dari gen fungsional. Pada daerah mengode, SNP dapat mengubah sekuen asam amino yang menyebabkan terjadinya variasi fenotipe (Lee *et al.*, 2009). Oleh karena itu, marka SNP mempunyai potensi yang besar untuk mendeteksi hubungan antara variasi sekuen DNA dan fenotipe (Rafalski, 2002).

Beberapa metode berbeda telah tersedia untuk *genotyping* marka SNP termasuk uji enzimatik dan *mismatch* kimia (Myers, Lumelsky, Lerman, & Maniatis, 1985), PCR spesifik alel (Newton, Graham, & Heptinstall, 1989), reaksi rantai ligase (Barany, 1994), analisis *single-strand confirmation polymorphism* (Labruno, Melle, Rey, 1994), uji penggabungan *primer-directed nucleotide* (Kuppuswami *et al.*, 1994), *di-deoxy fingerprinting* (Sarkar, Yoon, & Sommer, 1992), uji *solid-phase ELISA-based oligonucleotide ligation* (Nikiforov *et al.*, 1994), uji *oligonucleotide fluorescence-quenching* (Livak, Flood, Marmaro, Giusti, & Deetz, 1995), dan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) berbasis PCR (Botstein, White, Skolnich, Davis, 1980), seperti CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) (Konieczny & Ausubel, 1993) dan dCAPS (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*). Dari semua teknik di atas hanya RFLP berbasis PCR yang masih sering digunakan dalam analisis genetik tanaman menggunakan SNP karena mempunyai banyak keuntungan, yaitu sederhana, relatif murah, menggunakan teknologi PCR, pemotongan dengan enzim restriksi serta elektroforesis dengan gel agarose. Di samping itu, teknik ini berguna untuk mengetahui terjadinya mutasi pada populasi segregasi dan pemetaan genetik untuk kloning gen-gen baru berdasarkan pada posisinya (Neff, Neff, Chory, Pepper, 1998).

### **KEGUNAAN MARKA MOLEKULER DALAM PEMULIAAN TANAMAN KAKAO**

Marka molekuler merupakan alat pendukung yang cukup penting dalam kegiatan pemuliaan tanaman. Manfaat dari marka molekuler di antaranya adalah dapat membantu pemulia dalam mengidentifikasi dan mengelompokkan genotipe-genotipe tanaman kakao serta menentukan kombinasi tetua persilangan terbaik untuk mendapatkan hibrida dengan sifat yang unggul. Penggunaan marka molekuler dalam kegiatan pemuliaan tanaman dapat memberikan hasil yang lebih meyakinkan karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Penjelasan mengenai kegunaan marka molekuler dalam pemuliaan tanaman kakao dapat dilihat di bawah ini.

---

---

## Identifikasi Kultivar

Identifikasi kultivar sangat penting untuk tujuan paten, perlindungan hak pemulia, kontrol kemurnian benih dan deteksi aksesori atau klon di lapang. Untuk mengkonfirmasi kebenaran identitas dari suatu individu tanaman dapat digunakan marka molekuler (Collard & Mackill, 2008). Pada koleksi pertanaman kakao yang umumnya diperbanyak secara vegetatif, kesalahan pemberian label atau nama suatu klon rentan terjadi. Secara umum kesalahan pemberian label diperkirakan mencapai 15-44% pada koleksi kakao (Motilal & Butler, 2003). Hal ini dapat mengakibatkan ketidakseragaman bibit kakao yang disebarkan kepada petani. Dengan berkembangnya marka molekuler seperti marka SSR dan SNP telah meningkatkan efisiensi dan kapasitas analisis sidik jari serta identifikasi genotipe kakao sehingga kejadian kesalahan pelabelan dapat dihindari (Takrama *et al.*, 2014). Selain itu identifikasi kultivar dengan menggunakan marka molekuler juga dapat mengetahui adanya duplikasi di antara genotipe kakao pada kebun koleksi sehingga duplikat genotipe kakao tersebut selanjutnya dapat dihilangkan untuk lebih memudahkan dalam pengelolaan koleksi plasma nutfah kakao. Takrama *et al.* (2014) telah membuktikan keefektifan penggunaan marka SNP dalam mengidentifikasi beberapa genotipe kakao yang mempunyai nama/label berbeda tetapi ternyata secara genetik memperlihatkan hasil yang identik. Oleh karena itu, teknologi marka molekuler perlu diterapkan untuk mendeteksi ada tidaknya duplikasi genotipe kakao pada koleksi plasma nutfah.

## Analisis Keragaman Genetik

Keragaman genetik adalah variasi sekuen dalam spesies yang merupakan hasil dari seleksi alami pada nenek moyang liar dan intervensi manusia melalui petani dan pemulia (Duran, Appleby, Edwards, & Batley, 2009; Jing *et al.*, 2010). Informasi dan pengetahuan mengenai keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar individu sangat penting bagi para pemulia untuk perbaikan genetik tanaman. Hal ini karena program pemuliaan bergantung pada keragaman genetik yang tinggi untuk mencapai kemajuan dari proses seleksi (Collard & Mackill, 2008). Penggunaan marka molekuler seperti marka SSR dan SNP sangat diperlukan untuk mengkarakterisasi sumberdaya genetik tanaman karena hasilnya tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan.

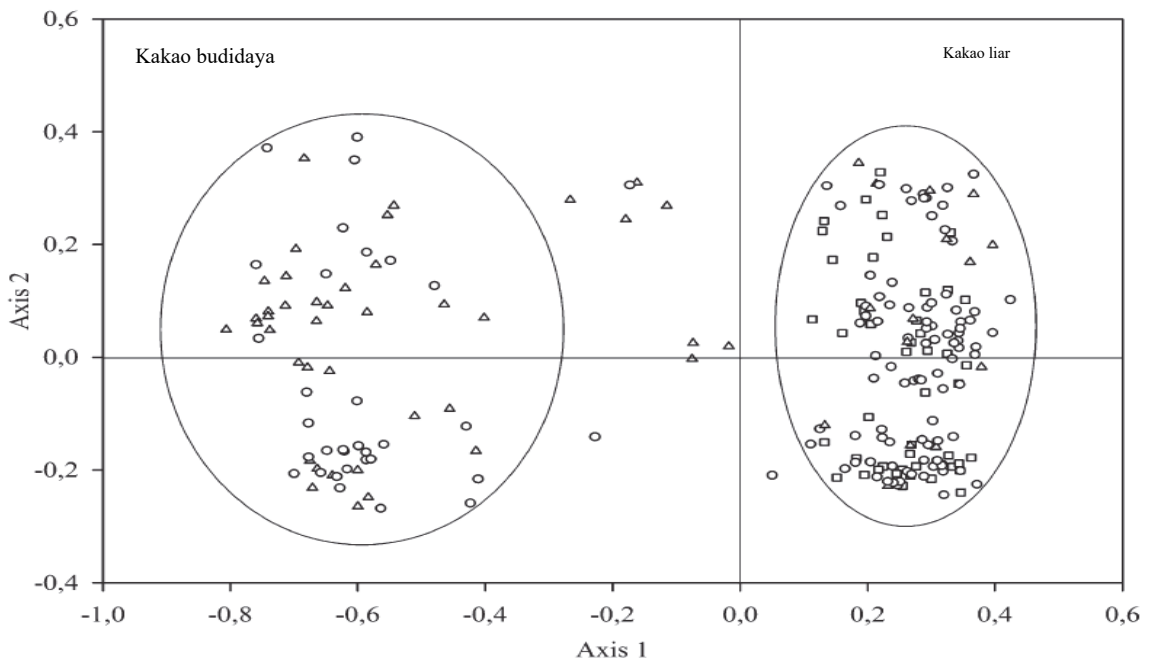
Aplikasi marka molekuler untuk karakterisasi plasma nutfah kakao sangat penting dilakukan untuk mengetahui secara pasti tingkat keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar genotipe. Mengingat selama ini sebagian dari koleksi plasma nutfah kakao diperoleh dari hasil eksplorasi atau introduksi yang tidak diketahui asal usul genetiknya. Di samping itu, secara genetik tanaman kakao termasuk tanaman menyerbuk silang, dimana proses rekombinasi melalui persilangan antar genotipe kakao tersebut memungkinkan

terbentuknya kelompok genetik baru (Susilo, 2007). Oleh karena itu, di lapang banyak ditemukan tanaman kakao hibrida hasil persilangan antar genotipe. Analisis keragaman genetik dengan menggunakan marka molekuler sangat membantu dalam mengelompokkan plasma nutfah kakao tersebut. Salah satu contoh penggunaan marka molekuler dalam pengelompokan plasma nutfah dilakukan oleh De Schawe, Durka, Tschardtke, Hensen, & Kessler (2013) yang berhasil mengelompokkan genotipe kakao di Bolivia menjadi dua grup, yaitu genotipe kakao budidaya dan kakao liar dengan menggunakan marka mikrosatelit (Gambar 1). Sementara Kurniasih, Rubiyo, Setiawan, Purwantara, & Sudarsono (2011) berhasil mengelompokkan 29 genotipe kakao koleksi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia menjadi tiga kelompok dengan menggunakan 39 marka SSR.

Analisis keragaman genetik juga dapat dilakukan untuk menentukan tetua persilangan terbaik. Kombinasi tetua persilangan biasanya dipilih berdasarkan nilai jarak genetiknya, genotipe-genotipe yang mempunyai nilai jarak genetik terjauh dapat dipertimbangkan sebagai kombinasi tetua persilangan yang paling baik. Pada kakao, penentuan jarak genetik antar genotipe telah dilakukan pada 15 genotipe dengan menggunakan 15 marka SSR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enam pasang genotipe kakao, yaitu DRC 15 dan Sca 6, ICS 13 dan Sca 6, PA 300 dan Sca 6, DRC 16 dan Sca 6, RCC 70, dan Sca 6 serta ICCRI 3 dan Sca 6 mempunyai jarak genetik yang jauh. Dengan demikian kombinasi pasangan genotipe kakao tersebut dapat digunakan sebagai alternatif untuk menghasilkan benih hibrida F1 karena akan menghasilkan keragaman populasi F1 yang tinggi (Rubiyo, 2013). Hal ini menunjukkan besarnya manfaat marka molekuler dalam menunjang program pemuliaan tanaman kakao.

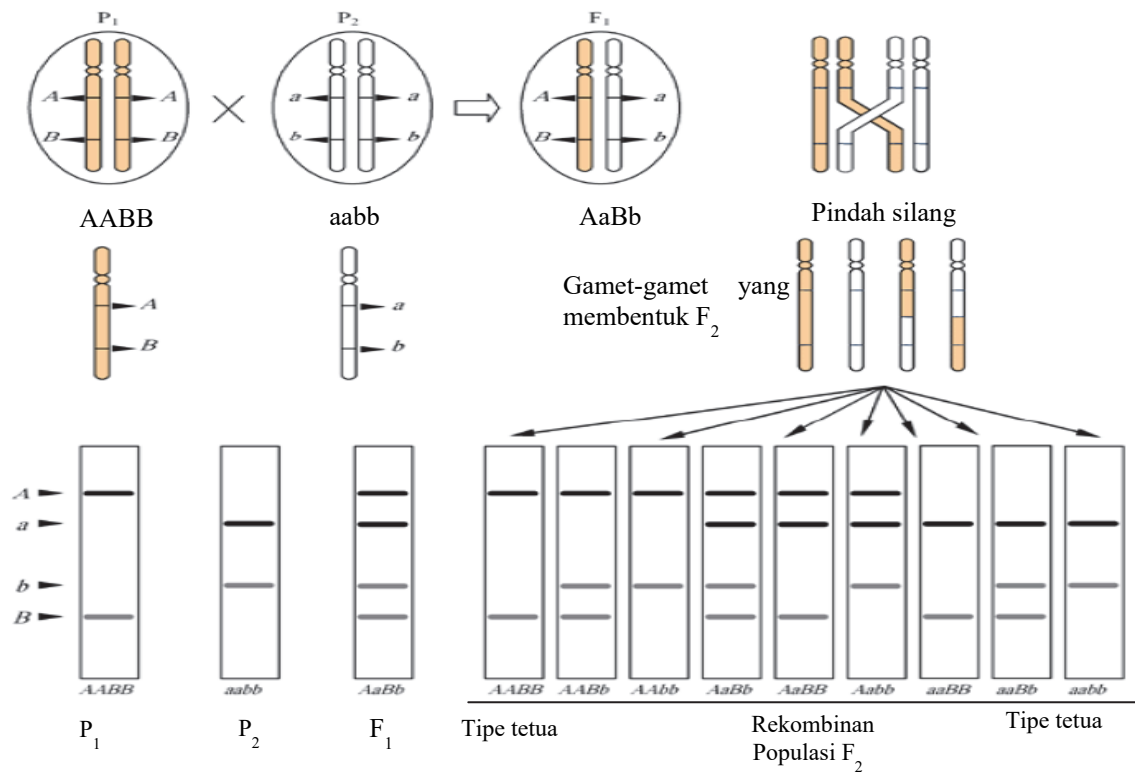
## Konstruksi Peta Genetik

Peta keterpautan genetik merupakan kerangka dasar untuk mengidentifikasi marka yang terpaut dengan sifat tertentu melalui pemetaan sifat kuantitatif (*quantitative trait loci*, QTL), kloning gen berdasarkan peta (*map-based cloning*) dan penjajaran peta fisik. Konstruksi peta genetik terdiri dari sejumlah marka molekuler pada populasi tertentu. Populasi segregasi seperti F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, atau *backcross* (BC) paling sering digunakan untuk pembuatan peta genetik, sedangkan untuk marka molekuler, semua tipe marka dapat dipakai dalam penyusunan peta genetik. Meskipun demikian, dalam perkembangannya hanya dua tipe marka, yaitu SSR dan SNP yang paling sering digunakan dalam pembuatan peta genetik. Peta genetik menempatkan marka molekuler ke dalam group keterpautan (*linkage group*) berdasarkan pada kosegregasinya dalam suatu populasi. Ukuran populasi dan kerapatan marka molekuler yang digunakan sangat penting untuk resolusi peta genetik (Duran *et al.*, 2009).



Gambar 1. *Principal component analysis (PCA)* dengan menggunakan marka mikrosatelit yang berhasil mengelompokkan kakao budidaya (segitiga), kakao liar (kotak) dan genotipe kakao yang belum diketahui (bulat) (Sumber: De Schawe *et al.*, 2013)

Figure 1. *Principal component analysis (PCA)* using microsatellite markers successfully discriminated cultivated cacao trees (triangles), wild cacao trees (squares) and unknown genotype trees (circles) (Source: De Schawe *et al.*, 2013)



Gambar 2. Dasar genetik dari pemetaan berdasarkan marka (Sumber: Vinod, 2009)  
 Figure 2. Genetic base of mapping based on molecular markers (Source: Vinod, 2009)

Prinsip dasar pada pemetaan genetik adalah adanya pautan dan rekombinasi. Pautan terjadi apabila lokus atau alel tertentu dari dua atau lebih gen yang terdapat pada kromosom yang sama diwariskan secara bersama-sama. Sebagai contoh, ada dua individu dengan genotipe AABB dan aabb, yang masing-masing menghasilkan satu tipe gamet jantan dan betina, AB dan ab. Persilangan antara kedua genotipe tersebut akan menghasilkan individu  $F_1$  dengan genotipe AaBb yang bersifat heterozigot. Individu  $F_1$  tersebut menghasilkan empat macam gamet, yaitu AB, ab, Ab dan aB. Gamet AB dan ab yang mirip dengan gamet yang diproduksi oleh tetua homozigot disebut dengan tipe tetua (*parental types*), sedangkan kedua gamet lainnya yang dihasilkan karena pindah silang antara lokus A dan B disebut dengan tipe rekombinan (*recombinant types*) (Gambar 2). Rekombinasi adalah proses terjadinya kombinasi baru dari gen-gen tetua karena pertukaran alel-alel dari lokus yang berbeda melalui pertukaran segmen kromosom antar kromosom homolog yang membawanya (Vinod, 2009). Proporsi rekombinasi di dalam jumlah total keturunan menyediakan informasi mengenai bagian dari pindah silang yang mengambil tempat di antara lokus yang disebut dengan frekuensi rekombinasi atau nilai pindah silang. Nilai frekuensi rekombinasi ini memberikan perkiraan tentang jarak di antara lokus, dengan asumsi jumlah pindah silang sebanding dengan jarak di antara dua lokus. Pada saat ini banyak program komputer seperti MAPMAKER, JoinMap, dan MapManager yang dapat digunakan untuk memperkirakan jarak genetik di antara dua lokus yang diukur dalam *centimorgan* (cM) serta mengelompokkannya pada grup keterpautan.

Pada kakao, peta genetik pertama dibuat oleh Lanaud *et al.* (1999) yang terdiri dari 195 marka, kebanyakan adalah marka *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs). Marka RFLP ini mempunyai beberapa kekurangan di antaranya prosesnya cukup panjang dan melelahkan serta memerlukan DNA dalam jumlah banyak dan kualitas tinggi sehingga membutuhkan teknik ultrasentrifugasi (Risterucci, Paulin, Ducamp, N'Goran, & Lanaud, 2003). Meskipun demikian, peta genetik tersebut digunakan sebagai poin awal dalam pembuatan peta keterpautan genetik pada tanaman kakao dengan kerapatan yang tinggi. Pada perkembangan selanjutnya, Risterucci *et al.* (2003) melengkapi peta genetik yang sudah dibuat sebelumnya. Sebanyak 424 marka yang terdiri dari lima isozim, enam marka dari gen yang telah diketahui fungsinya, 65 marka genomik RFLP, 104 marka cDNA RFLP, tiga probe telomerik, 30 marka RAPD, 191 marka AFLP, dan 20 marka mikrosatelit berhasil dipetakan dengan rata-rata jarak antar marka 2,1 cM. Penambahan jumlah marka yang digunakan pada peta genetik kedua dapat mengisi kekosongan (*gap*) antar marka yang terdapat pada peta genetik pertama. Dengan semakin berkembangnya marka mikrosatelit pada tanaman kakao, maka pada tahun 2004 peta genetik kakao yang sudah dikonstruksi sebelumnya diperbaharui lagi dengan menambahkan sebanyak 201 marka mikrosatelit baru. Panjang peta genetik ketiga ini mencapai 782,8 cM dengan rata-rata interval antar marka adalah 1,7 cM (Pugh *et al.*, 2004). Disimpulkan bahwa dengan semakin banyaknya jumlah

marka yang digunakan pada pembuatan peta genetik kakao maka akan semakin meningkat pula kerapatan antar marka pada peta genetik tersebut. Peta genetik kakao dengan kerapatan antar marka yang tinggi dapat lebih memudahkan dalam identifikasi marka molekuler yang terkait dengan sifat tertentu.

### Deteksi Sifat Kuantitatif

Lokus sifat kuantitatif atau dikenal juga dengan QTL adalah suatu daerah pada genom yang berhubungan dengan efek pada sifat kuantitatif. Secara konsep, QTL dapat berupa gen tunggal atau bisa juga merupakan kumpulan gen saling terpaut yang mempengaruhi suatu sifat. Tujuan utama dari deteksi QTL adalah menjelaskan pengaruh dari tiap daerah genomik pada sifat kuantitatif yang diinginkan, seperti (1) mendeteksi daerah mana pada genom yang mempengaruhi suatu sifat; (2) menjelaskan efek dari QTL pada sifat tertentu (berapa banyak variasi untuk suatu sifat tertentu yang disebabkan oleh daerah spesifik, aksi gen apa yang terkait dengan QTL-aditif atau dominan, alel mana yang terkait dengan efek yang diinginkan); dan (3) menetapkan nilai pemuliaan (*breeding value*) dari suatu galur berdasarkan pada genotipnya pada satu atau lebih QTL (Vinod, 2009).

Deteksi lokus sifat kuantitatif atau QTL pada tanaman kakao sangat penting untuk dilakukan, hal ini karena sifat-sifat penting pada tanaman kakao seperti komponen daya hasil serta ketahanan terhadap hama dan penyakit pada umumnya dikendalikan oleh banyak gen/poligenik sehingga diekspresikan secara kuantitatif (Susilo, 2007). Oleh karena itu diperlukan analisis QTL untuk mengetahui gen-gen yang berperan dalam mengendalikan suatu sifat tertentu. Beberapa QTL pada tanaman kakao telah berhasil diidentifikasi, di antaranya adalah QTL yang terkait dengan karakter pertumbuhan dan pembungaan (Crouzillat *et al.*, 1996), komponen daya hasil (Crouzillat, Ménard, Mora, Phillips, & Pétiard, 2000b; Clement, Risterucci, Motamayor, N'Goran, & Lanaud, 2003) serta ketahanan terhadap penyakit busuk buah (Crouzillat, Bellanger, Rigoreau, Bucheli, & Pétiard, 2000a; Risterucci *et al.*, 2003). Lokus sifat kuantitatif (QTL) pada masing-masing sifat fenotipik tersebut kebanyakan teridentifikasi dalam jumlah lebih dari satu serta terletak pada grup keterpautan yang berbeda. Dari beberapa QTL yang berhasil dideteksi, ada yang mempunyai pengaruh dominan atau pengaruh yang besar terhadap suatu sifat fenotipik dan disebut sebagai QTL utama (*major QTL*), serta terdapat juga QTL yang mempunyai kontribusi kecil terhadap sifat fenotipik yang disebut sebagai QTL tambahan (*minor QTL*). Apabila marka molekuler tertentu diketahui terpaut sangat erat dengan QTL utama maka marka tersebut nantinya dapat digunakan sebagai kandidat dalam proses seleksi dengan metode *marker-assisted selection* (MAS). Sebelum digunakan dalam metode MAS maka marka molekuler tersebut harus melalui serangkaian uji validasi terlebih dahulu.

### TEKNIK MARKER-ASSISTED SELECTION PADA PEMULIAAN TANAMAN

Penggunaan marka molekuler dalam pemuliaan tanaman dikenal dengan istilah *marker-*

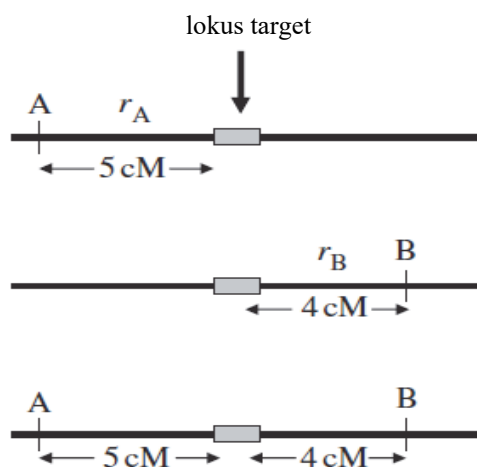
*assisted selection* (MAS) dan merupakan komponen dari disiplin baru, yaitu pemuliaan berbasis molekuler. Hal mendasar yang perlu dilakukan dalam program pemuliaan adalah seleksi tanaman dengan sifat yang diinginkan. Kegiatan seleksi dengan metode MAS menjadi lebih efektif dan efisien karena hanya berdasarkan pada sifat genetik tanaman, tanpa pengaruh dari faktor lingkungan (Azrai, 2006). Terdapat lima pertimbangan utama dalam menggunakan marka DNA pada metode MAS, yaitu (1) tingkat reliabilitas, marka yang digunakan sebaiknya terpaut erat pada lokus target dengan jarak genetik kurang dari 5 cM. Penggunaan marka pengapit atau marka intragenik akan meningkatkan reliabilitas marka tersebut dalam memprediksi fenotipe (Gambar 3); (2) kuantitas dan kualitas DNA, beberapa teknik marka molekuler membutuhkan DNA dalam jumlah banyak dan kualitas bagus, kadang-kadang sulit untuk mendapatkannya, dan hal ini akan menyebabkan bertambahnya biaya yang dibutuhkan; (3) prosedur teknis, proses yang sederhana dan waktu yang dibutuhkan untuk teknik MAS merupakan pertimbangan yang cukup penting; (4) tingkat polimorfis, idealnya marka molekuler mempunyai tingkat polimorfis tinggi pada materi pemuliaan, yaitu harus dapat membedakan antara genotipe yang berbeda, khususnya pada bahan pemuliaan inti; dan (5) biaya, uji marka sebaiknya yang hemat biaya agar MAS dapat dikerjakan dengan mudah (Mackill & Ni, 2000; Mohler & Singrun, 2004)

Dari gambar 3 tersebut diketahui bahwa frekuensi rekombinasi di antara lokus target dan marka A diperkirakan 5% (5 cM). Oleh karena itu, terjadinya rekombinasi antara lokus target dan marka B diperkirakan 5% dari progeni, sedangkan frekuensi rekombinasi di antara lokus target dan marka B diperkirakan 4% (4 cM). Sementara itu, peluang terjadinya rekombinasi antara kedua marka, yaitu marka A and marka B (pindah silang ganda) diketahui lebih rendah dibandingkan marka tunggal (kira-kira 0,4%). Oleh karena itu, reliabilitas seleksi lebih besar ketika menggunakan marka pengapit

(Collard & Mackill, 2008).

Teknik MAS memungkinkan para pemulia untuk mencapai seleksi awal dari suatu sifat tertentu dalam program pemuliaan, yang sangat berguna apabila sifat tersebut berada di bawah kontrol genetik kompleks, atau ketika uji fenotipik tidak dapat diandalkan atau berbiaya tinggi (Duran *et al.*, 2009). Lebih lanjut, keuntungan mendasar dari MAS dibandingkan seleksi secara konvensional adalah (1) lebih sederhana dibandingkan skrining fenotipik karena dapat menghemat waktu, sumber daya, dan tenaga; (2) seleksi dapat dilakukan pada tahap pembibitan. Hal ini sangat bermanfaat untuk banyak sifat, terutama pada sifat-sifat yang terekspresi pada tahap akhir perkembangan sehingga tanaman dengan genotipe yang tidak diinginkan dapat dieliminasi dengan cepat. Pada tanaman kakao yang merupakan tanaman tahunan, seleksi pada tahap pembibitan dapat lebih memperpendek waktu; (3) dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman tunggal. Skrining dengan metode konvensional memerlukan banyak tanaman karena adanya pengaruh lingkungan, sedangkan dengan metode MAS, seleksi tanaman tunggal dapat dilakukan berdasarkan pada genotipenya (Collard & Mackill, 2008).

Beberapa manfaat lain dari marka molekuler yang dapat mendukung para pemulia dalam merakit varietas baru antara lain: (1) mempercepat introgresi gen-gen ketahanan tunggal untuk patogen tanaman seperti virus, bakteri, jamur, nematoda atau serangga, dari spesies liar atau galur donor budidaya ke dalam kultivar unggul; (2) mengakumulasi (piramida) gen-gen ketahanan mayor dan minor ke dalam kultivar untuk menghasilkan ketahanan yang lebih tahan lama (ketahanan horizontal) terhadap beberapa patotipe dari patogen yang sama; (3) meningkatkan nilai agronomi tanaman dengan pemuliaan untuk sifat kuantitatif seperti hasil, buah dan kadar protein, kekeringan serta toleran terhadap suhu dingin (Winter & Kahl, 1995).



reliabilitas untuk seleksi

Menggunakan marka A saja:

$$1 - r_A = \sim 95\%$$

Menggunakan marka B saja:

$$1 - r_B = \sim 96\%$$

Menggunakan kedua marka A dan B:

$$1 - 2 r_A r_B = \sim 99,6\%$$

Gambar 3. Reliabilitas seleksi menggunakan marka tunggal dan marka pengapit (diasumsikan tidak ada pengaruh pindah silang) (Sumber: Collard & Mackill, 2008)

Figure 3. Reliability of selection using single and flanking markers (assuming no crossover interference) (Source: Collard & Mackill, 2008)

---

---

Dengan demikian dapat dikatakan bahwa keberadaan marka molekuler ini sangat membantu dalam program pemuliaan konvensional. Marka molekuler merupakan alat pendukung yang sangat bermanfaat bagi para pemulia dalam upaya perbaikan genetik tanaman untuk mendapat varietas unggul dengan sifat yang diinginkan.

### **PROSPEK PENGGUNAAN MARKA MOLEKULER PADA PERBAIKAN GENETIK TANAMAN KAKAO DI INDONESIA**

Tanaman kakao merupakan salah satu komoditas unggulan tanaman perkebunan. Hal ini karena kakao dapat digunakan sebagai bahan baku industri pada berbagai produk pangan olahan maupun produk kosmetik sehingga permintaan akan biji kakao terus meningkat dari tahun ke tahun. Dalam upaya untuk meningkatkan produktivitas dan menjaga kontinuitas produksi kakao di Indonesia, diperlukan bahan tanam atau klon-klon yang unggul, yaitu yang mempunyai tingkat produksi tinggi serta tahan terhadap hama dan penyakit utama. Klon-klon unggul kakao tersebut diperoleh melalui proses pemuliaan yang cukup panjang. Untuk mendukung program pemuliaan tanaman kakao maka penggunaan teknologi terkini seperti teknologi marka molekuler seperti yang telah dijelaskan di atas dapat dipertimbangkan.

Saat ini, penggunaan marka molekuler pada tanaman kakao di Indonesia masih terbatas pada tahap mengetahui tingkat keragaman genetik antar genotipe kakao, identifikasi kultivar serta penentuan kombinasi tetua persilangan terbaik dalam rangka mendapatkan klon hibrida unggul (Kurniasih *et al.*, 2014; Syafaruddin & Nasution, 2012; Rubiyono, Sudarsono, Siswanto, Indah, & Cicu, 2014). Meskipun demikian, informasi yang diperoleh dapat digunakan sebagai acuan dalam program pemuliaan selanjutnya. Kedepannya penggunaan marka molekuler pada kakao akan lebih luas lagi, salah satunya yang akan dilakukan dalam waktu dekat adalah pembuatan peta genetik kakao yang dapat digunakan sebagai pondasi untuk mengidentifikasi gen-gen yang terkait dengan sifat tertentu. Di samping itu, juga tengah dikembangkan marka-marka mikrosatelit dan SNP baru yang secara spesifik didesain dari sekuen genom tanaman kakao yang berasal dari kebun koleksi kita sendiri. Diharapkan dapat menambah jumlah marka molekuler yang bisa dimanfaatkan sebagai alat bantu dalam program pemuliaan, misalnya dalam pembuatan peta genetik. Dengan semakin banyaknya jumlah marka molekuler yang digunakan akan dapat meningkatkan reliabilitas marka yang terpaut erat dengan sifat tertentu. Di lain pihak, marka-marka yang baru didesain tersebut juga dapat dipakai bersama oleh lembaga penelitian yang berbeda untuk meningkatkan kualitas penelitian yang berbasis marka molekuler.

Dengan semakin meningkatnya penggunaan marka molekuler pada program pemuliaan tanaman kakao diharapkan dapat membantu dalam

percepatan pembentukan varietas unggul baru kakao dengan sifat yang diinginkan.

### **PENUTUP**

Teknologi marka molekuler telah terbukti sebagai alat pendukung yang meyakinkan dalam program pemuliaan tanaman kakao. Penggunaan marka molekuler diketahui dapat memberikan hasil yang cepat dan akurat karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Beberapa manfaat yang dapat diperoleh dari penggunaan marka molekuler adalah (1) mengidentifikasi kultivar yang terdapat pada kebun koleksi plasma nutfah, agar tidak terdapat duplikasi kultivar atau kesalahan dalam pelabelan; (2) mengetahui tingkat keragaman genetik klon-klon kakao; (3) konstruksi peta genetik dalam penentuan lokasi lokus sifat kuantitatif (QTL) pada grup keterpautan; dan (4) proses seleksi marka yang terpaut erat dengan sifat fenotipik tertentu

Pada tanaman kakao, aplikasi marka molekuler pada program pemuliaan dapat memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk memperoleh varietas unggul. Hal ini cukup menguntungkan mengingat kakao merupakan tanaman tahunan. Dengan demikian, marka molekuler mempunyai peran yang cukup besar dalam membantu pemulia merakit varietas unggul dengan sifat yang diinginkan.

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Adams, M.D., Soares, M.B., Kerlavage, A.R., Fields, C., & Venter, J.C. (1993). Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nat Genet*, 4, 373-380.
- Azrai, M. (2006). Sinergi teknologi marka molekuler dalam pemuliaan tanaman jagung. *Jurnal Litbang Pertanian*, 25(3), 81-89.
- Bahagiawati. (2012). Kontribusi teknologi marka molekuler dalam pengendalian wereng coklat. *Pengembangan Inovasi Pertanian*, 5(1), 1-18.
- Barany, F. (1991). Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci*, 88, 189-193.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnich, M., & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map of man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32, 314-331.
- Clement, D., Risterucci, A.M., Motamayor, J.C., N'Goran, J., & Lanaud, C. (2003). Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome*, 46, 204-212.
- Collard, B.C.Y., & Mackill, D.J. (2008). Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363, 557-572.

- Crouzillat, D., Lerceteau, E., Petiard, V., Morera, V., Rodriguez, J., Walker, D., ... Fritz, P. (1996). *Theobroma cacao* L.: A genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theor. App. Genet.*, *93*, 205-214.
- Crouzillat, D., Bellanger, L., Rigoreau, M., Bucheli, P., & Pétiard, V. (2000a). Genetic structure, characterization and selection of national cocoa compared to other genetic groups. In : F. Bekele, M. End & A. Eskes (Eds.), *Proceeding of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding* (pp. 47-55). Kota Kinabalu, Malaysia.
- Crouzillat, D., Ménard, B., Mora, A., Phillips, W., & Pétiard, V. (2000b). Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. *Euphytica*, *114*, 13-23.
- De Schawe, C.C., Durka, W., Tschardtke, T., Hensen, I., & Kessler, M. (2013). Gene flow and genetic diversity in cultivated and wild cacao (*Theobroma cacao* L.) in Bolivia. *American Journal of Botany*, *100*(11), 2274-2279.
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D., & Batley, J. (2009). Molecular Genetic Markers: Discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatic*, *4*, 16-27.
- Hendre, P.S., & Aggarwal, R.K. (2007). DNA markers: Development and application for genetic improvement of coffee. In R.K. Varshney & R. Tuberosa (Eds.), *Genomics Assisted Crop Improvement, Genomics Applications in Crops* (pp. 399-434). Springer.
- 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.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A.K. (2011). Microsatellite Markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, *177*, 309-334.
- Konieczny, A., & Ausubel, F.M. (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J*, *4*, 403-410.
- Kuppuswami, M.N., Hoffman, J.W., Kasper, C.K., Spitzer, S.G., Groce, S.L., & Bajaj, S.P. (1991). Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proc Natl Acad Sci*, *88*, 1143-1147.
- Kurniasih, S., Rubiyono, Setiawan, A., Purwantara, A., & Sudarsono. (2011). Analisis Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Berdasarkan Marka SSR. *Jurnal Littri*, *17*(4), 156-162.
- Labruno, P., Melle, D., & Rey, F. (1991). Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. *Am J Hum Genet*, *48*, 1115-1120.
- 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. *Mol Ecol*, *8*, 2142-2152.
- Lee, G.-A., Koh, H.-J., Chung, H.-K., Dixit, A., Chung, J.-W., Ma, K.-H., ... Park, Y.-J. (2009). Development of SNP-based CAPS and dCAPS markers in eight different genes involved in starch biosynthesis in rice. *Mol Breeding*, *24*, 93-101.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, *4*, 357-362.
- Mackill, D. J., & Ni, J. (2000). Molecular mapping and marker assisted selection for major-gene traits in rice. In G. S. Khush, D. S. Brar & B. Hardy (Eds.), *Proc. Fourth Int. Rice Genetics Symp* (pp. 137-151). Los Banos, The Philippines: International Rice Research Institute.
- Mohler, V., & Singrun, C. (2004). General considerations: Marker-assisted selection. In H. Lorz & G. Wenzel (Eds.), *Biotechnology in agriculture and forestry, Molecular marker systems* (pp. 305-317). Berlin, Germany: Springer.
- Motilal, L., & Butler, D. (2003). Verification of identities in global cacao germplasm collections. *Genet Resour Crop Evol*, *50*(8), 799-807.
- Myers, R.M., Lumelsky, N., Lerman, L.S., & Maniatis, T. (1985). Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature*, *313*, 495-498.
- Neff, M., Neff, J., Chory, J., & Pepper, A. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: Experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *The Plant Journal*, *14*(3), 387-392.
- Newton, C.R., Graham, A., & Heptinstall, L.E. (1989). Analysis of any point mutation in DNA, The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, *17*, 2503-2516.
- Nikiforov, T.T., Rendle, R.B., Golet, P., Rogers, Y.H., Kotewicz, M.L., Anderson, S., ... Knapp, M.R. (1994). Automated DNA diagnostics using an ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Nucl Acids Res*, *22*, 4167-4175.

