

Pengembangan Identitas Spesifik Berbasis Marka SSR pada 29 Varietas Kedelai Lokal Indonesia
(Development of SSR-Based Specific Identity on 29 Indonesian Local Soybean Varieties)

Puji Lestari, Andari Risliawati, Dwinita Wikan Utami, Nurul Hidayatun, Tri Joko Santoso & Chaerani

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Balitbangtan,
Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111. E-mail: plestari129@yahoo.com

Memasukkan: September 2015, **Diterima:** April 2016

ABSTRACT

Soybean is an important legume crop in Indonesia and local varieties from different regions are diversified. Accurate identification of local varieties is needed to determine the genetic identity in order to protect them to indicate the geographical origin and registration purpose. This study aimed to analyze DNA fingerprints of local varieties of soybean in Indonesia to develop a specific identity using SSR markers along with the marker set. A total of 29 local varieties/accessions was analyzed using 9 selected SSR markers with semi automated genetic analyzer on the basis of capillary electrophoresis. Total markers successfully detected 50 alleles in all varieties, with the average polymorphism information content (PIC) of each locus (0.579) and the genetic diversity index (0.629) were quite high as a reflection of diversity of the local varieties. Based on the analysis of the genetic diversity index, PIC, rare alleles, dominant allele frequency, analysis of genetic distance, 6 SSRs (Satt009, Satt038, Satt177, Satt242, Satt308 and Satt114) were selected as a set of markers for variety identification. Although three varieties can not be distinguished because of their close genetic relationship, but the digital coding indicates that local varieties of soybeans have possessed specific identities (ID) representing variation of SSR alleles. The selected SSR loci with additional identifier can be used to develop ID of Indonesian local soybean in the germplasm collection. Overall, the marker set is a powerful tool to complement morphological markers for the protection of local soybean varieties that contribute in accelerating local varieties improvement in the future agriculture.

Keywords: specific identity, SSR, Indonesian local soybean variety, DNA fingerprint.

ABSTRAK

Kedelai merupakan tanaman pangan penting di Indonesia dengan keragaman varietas lokal yang berasal dari berbagai daerah cukup tinggi. Identifikasi varietas kedelai secara akurat diperlukan untuk menentukan identitas genetik dalam upaya perlindungan varietas yang mengindikasikan asal varietas tersebut dan untuk keperluan registrasi. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sidik jari DNA varietas lokal kedelai Indonesia guna membuat penciri spesifik varietas menggunakan marka SSR sekaligus membuat set markanya. Sebanyak 29 aksesi/varietas lokal dianalisis secara molekuler menggunakan sembilan marka SSR terseleksi yang disemiautomatisasi dengan alat *Genetic Analyzer* berbasis elektroforesis sistem kapiler. Total marka berhasil mendeteksi 50 alel pada total varietas, dengan rata-rata *polymorphism information content* (PIC) tiap lokus (0,579) dan indeks keragaman genetik (0,629) cukup tinggi sebagai refleksi sangat beragamnya varietas lokal kedelai tersebut. Berdasarkan analisis dengan parameter indeks keragaman genetik, PIC, alel jarang, frekuensi alel dominan, analisis jarak genetik, terpilih 6 SSRs (Satt009, Satt038, Satt177, Satt242, Satt308 dan Satt114) sebagai set marka untuk identifikasi varietas. Meskipun tiga varietas belum dapat dibedakan mengingat sangat dekat genetiknya, namun hasil koding digital menunjukkan bahwa varietas lokal kedelai telah berhasil mempunyai penciri khusus (identitas/ID) yang merepresentasikan variasi alel SSR. Lokus SSR terpilih tersebut dengan tambahan marka identifier dapat digunakan untuk membuat ID varietas lokal kedelai Indonesia pada koleksi plasma nutfah. Jadi set marka tersebut merupakan alat ampuh yang melengkapi marka morfologi untuk perlindungan varietas lokal kedelai yang berkontribusi dalam mempercepat pengembangan varietas lokal untuk pertanian ke depannya.

Kata Kunci: identitas spesifik, SSR, kedelai lokal Indonesia, sidik jari DNA.

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan komoditas pangan nasional yang menempati posisi ketiga setelah padi dan jagung. Indonesia dengan wilayah yang luas dan kondisi eko-geografi yang bervariasi

telah mendukung tingginya keanekaragaman plasma nutfah, termasuk kedelai. Namun demikian menurut Sumarno (1998) keragaman genetik kedelai relatif rendah dikarenakan adanya pengaruh seleksi alami dan adaptasi. Koleksi plasma nutfah kedelai meliputi varietas unggul hasil persilangan, galur-galur hasil

persilangan dan mutasi, kedelai introduksi dan varietas lokal yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia. Varietas lokal yang tersebar di berbagai daerah di Indonesia tersebut, beberapa diantaranya spesifik hanya dibudidayakan dan populer di daerah tertentu dan berpotensi menjadi varietas unggul melalui program pemuliaan ataupun evaluasi (Cahyarini *et al.* 2004).

Varietas lokal kedelai telah banyak dikoleksi dan diberi nomor registrasi di bank gen seperti Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), dan Balai Penelitian Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian (Balitkabi) di bawah Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan). Plasma nutfah varietas lokal kedelai yang tersebar di berbagai daerah perlu dikonservasi dan dipreservasi. Variasi plasma nutfah kedelai lokal juga memberikan peluang untuk dimanfaatkan secara optimal sebagai materi pemuliaan. Karena potensinya yang tinggi, koleksi varietas lokal perlu dilindungi berdasarkan identitas genetiknya. Perlindungan varietas berdasarkan asal daerah akan berimplikasi bahwa kualitas dan/atau karakter spesifik yang dimiliki adalah penting terkait penelusuran asal-usulnya (Commission of the European Communities 2006; Prohens *et al.* 2008).

Keragaman karakter morfologi varietas lokal kedelai di Indonesia merupakan sumber potensial sebagai materi persilangan ataupun varietas unggul yang spesifik di daerah asal. Secara konvensional, deskriptor morfologi secara rutin digunakan untuk mengidentifikasi varietas. Namun deskriptor morfologi banyak dipengaruhi lingkungan khususnya pada ekspresi karakter, interaksi epistasis, efek pleiotrofi dan lainnya. Deskriptor tersebut belum memadai pada jumlah plasma nutfah yang makin banyak sehingga memerlukan koleksi rujukan varietas yang memaksa harus mencari alternatif. Mengingat perbedaan genetik antara individu didasarkan pada variasi sekuen DNA genom, maka metode identifikasi varietas tanaman termasuk kedelai dapat melalui perbandingan profil sidik jari DNA (Heckenberger *et al.* 2002; Saad 2004).

Terminologi sidik jari DNA yang ditemukan sebelumnya (Jeffreys *et al.* 1985) adalah unik pada tiap individu sehingga dapat digunakan untuk identifikasi individu secara spesifik (Henry 2001). Banyak jenis marka molekuler dengan teknik PCR yang dimanfaatkan untuk analisis sidik jari DNA

seperti *random amplified polymorphism DNA* (RAPD) (Pan *et al.* 2003), *sequence tagged microsatellite* (STMS) dan *simple sequence repeat* (SSR) (Pan *et al.* 2007). Variasi *single nucleotide polymorphism* (SNP) berdasarkan sekuensing juga telah sering digunakan karena kemudahan aplikasi secara *high throughput* (Silva & Bressiani 2005). Sidik jari secara efisien juga telah diperoleh menggunakan platform sekuensing target dengan *high throughput* (Monden *et al.* 2014).

Marka SSR lebih sering digunakan dalam analisis sidik jari DNA karena tingkat polimorfisme dan reproduibilitasnya tinggi, level keahlian yang diperlukan medium sampai tinggi dan dapat diotomatisasi. Marka SSR telah banyak digunakan di berbagai spesies tanaman seperti jagung (Sharopova *et al.* 2002), padi (Zhu *et al.* 2012) dan tebu (Hameed *et al.* 2012). Analisis sidik jari DNA dengan SSR pada plasma nutfah kedelai telah dilakukan untuk berbagai tujuan terutama genetika molekuler, seperti identifikasi plasma nutfah kedelai dari koleksi USDA (Rongwen *et al.* 1995), berdasarkan sensitivitas fotoperiode (Singh *et al.* 2010), identifikasi kedelai Thailand (Tantasawat *et al.* 2011) dan kultivar kedelai dari NRC, India (Ghosh *et al.* 2014).

Sampai saat ini teknologi sidik jari DNA ini memang sudah dimanfaatkan dalam meningkatkan manfaat sumberdaya genetik kedelai Indonesia namun masih cenderung ke arah pemuliaan. Analisis sidik jari DNA pada koleksi plasma nutfah kedelai masih ditujukan untuk mengetahui keragaman genetik dan identifikasi varietas kedelai secara umum (Santoso *et al.* 2006; Chaerani *et al.* 2011). Pembuatan identitas/penciri spesifik varietas/aksesi lokal menggunakan sidik jari DNA diharapkan dapat memberi perlindungan varietas lokal dan membedakan berbagai varietas yang memiliki nama sama namun berasal dari daerah berbeda ataupun duplikasi selama pengelolaan plasma nutfah. Mengingat marka yang menghasilkan profil sidik jari DNA dari sebagian besar varietas kedelai belum ada, maka set markanya perlu dikembangkan untuk mengidentifikasi varietas secara efisien. Berdasarkan pertimbangan tersebut di atas, penelitian ini bertujuan untuk identifikasi varietas lokal kedelai dengan sistem digital menggunakan set marka molekuler SSR yang dikembangkan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Total 29 varietas lokal kedelai yang berasal dari berbagai daerah di Indonesia digunakan dalam studi ini. Ke-29 varietas tersebut terdiri dari dua varietas dari Sumatera Barat, satu dari Lampung, empat dari Jawa Barat, tiga dari Jawa tengah, 10 dari Jawa Timur, satu dari Kalimantan Timur, satu dari Sulawesi Selatan, tiga dari Bali, satu dari Nusa Tenggara Barat dan tiga tidak diketahui asal daerahnya. Semua varietas tersebut merupakan koleksi bank gen BB Biogen-Balitbangtan.

Semua individu tanaman ditanam di polibag di rumah kaca sampai umur sekitar satu bulan dan dikoleksi daunnya yang sehat dan muda. Daun dapat disimpan di -80°C sampai digunakan. Daun digerus sampai menjadi bubuk halus dengan bantuan nitrogen cair di atas pastle dan mortar. DNA diisolasi dengan metode *cytlymethylammonium bromide* (CTAB) sesuai protokol (Keim *et al.* 1988). DNA total yang diisolasi dilarutkan dalam *buffer* TE dan ditentukan konsentrasi dan kemurniannya menggunakan NanoDrop spektrofotometer dan elektroforesis 0,8-1% gel agarosa. Setelah *staining* DNA dalam *ethidium bromide*, visualisasi DNA dilakukan dengan Chemidoc XRS (Bio-Rad).

Sembilan dari 14 marka SSR yang mempunyai nilai *polymorphism information content* (PIC) lebih dari 0,5 dipilih sesuai informasi sebelumnya (Rongwen *et al.* 1995). Primer SSR beserta sekuennya dapat diakses di <http://soybean.org/resources/ssr.php>. DNA genomika tiap varietas diamplifikasi menggunakan primer *forward* yang

ditambah sekuen primer universal M13 yang berfungsi sebagai adapter, primer reverse dan primer M13 yang dilabel *fluorescent* (Chaerani *et al.* 2009). Program FastStart PCR (mesin Biometra) dilakukan sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C , 4 menit; kemudian 40 siklus dengan 95°C denaturasi selama 45 detik, $55-60^{\circ}\text{C}$ *annealing* selama 45 detik dan 72°C elongasi selama 30 detik; dan final *extension* 72°C selama 5 menit. Sebelum fragmen amplikonnya dianalisis dengan mesin *Genetic Analyzer* (Beckman CEQ8000), produk PCR dicek dengan gel agarosa. Untuk deteksi fragmen SSR, semua primer dilabel dengan tiga warna *fluorescent* yang berbeda (hitam, hijau dan biru) dan dijalankan dalam tiga panel multipleks di *Genetic Analyzer/GA* (Tabel 1).

Produk PCR disiapkan untuk deteksi fragmen SSR pada *Genetic Analyzer* mengikuti protokol (Thomson 2004). Produk PCR diencerkan dengan larutan *sample loading solution* (SLS) dengan rasio 1:6 (v/v). Untuk setiap set panel multipleks, produk PCR yang diencerkan dari tiga primer SSR yang berlabel *fluorescent* berbeda dimasukkan ke sumur yang sama pada *plate* sampel CEQ. Larutan SLS dan 0,5 μl standar internal CEQ dengan ukuran 400 bp ditambahkan pada sumur sampai mencapai volume 40 μl . Untuk mencegah evaporasi selama preparasi dan running di mesin, mineral oil diteteskan pada tiap sumur. Pada *plate* lainnya (*CEQ buffer plate*), *buffer* CEQ ditambahkan sampai 3/4 bagian sumur. Kemudian, kedua *plate* diletakkan di mesin CEQ8000 dan program *Frag-1* dijalankan dengan kondisi sebagai berikut suhu kapiler 35°C , injeksi 2,0 kV selama 30 detik, denaturasi pada 90°C selama

Tabel 1. Panel multipleks primer SSR yang digunakan untuk analisis profil sidik jari 29 varietas lokal kedelai dengan *Genetic Analyzer* (Beckman CEQ8000).

Panel multipleks	Primer SSR*	Warna Fluorescent	Kromosom	Motif
1	Satt009	D2-hitam	3	(AAAT)3(AAT)13
	Satt038	D3-hijau	18	(ATA)17
	Satt114	D4-biru	13	(AAT)17
2	Satt242	D2-hitam	9	(TTA)26
	Satt177	D3-hijau	8	(ATT)16
	Satt343	D4-biru	10	(TAT)17
3	Satt147	D2-hitam	1	(ATA)15
	Satt308	D2-hitam	7	(TTA)22
	Satt414	D4-biru	16	(ATT)23

*Primer kedelai dapat diakses di <http://soybase.org/resources/ssr.php>

120 menit dan separasi pada 7,5 kV selama 35 menit. Setelah 12 jam, fragmen DNA dapat dilihat di layar monitor sebagai puncak-puncak (peak) dengan warna yang berlainan sesuai pelabelan.

Ukuran alel dari tiap fragmen SSR yang diperoleh dari GA CEQ8000 dianalisis untuk pengelompokkan (*binning*) dengan *CEQ Fragment Analysis Software* (Thomson 2004). Ukuran alel setiap lokus hasil GA dicek secara teliti presisinya. Pengelompokkan berdasarkan jumlah pengulangan SSR di-, tri-, or tetra- nukleotida. Data skor lokus SSR diperlukan untuk mendapatkan akurasi dalam diskriminasi varietas. Data skoring alel berdasarkan frekuensinya dianalisis dengan PowerMarker V3.25 untuk memperoleh informasi keragaman genetik, frekuensi polimorfisme PIC, heterosigositas tiap marka (Liu *et al.* 2011). Informasi tersebut penting digunakan sebagai kriteria dasar untuk seleksi marka sebagai kandidat identifikasi varietas. Secara paralel dengan pemilihan lokus SSR untuk set marka, prosedur kalkulasi jarak genetik semua koleksi berdasarkan marka tetap dilakukan untuk memaksimalkan efisiensi diferensiasi varietas. Analisis kluster dibuat menggunakan perangkat lunak statistika SPSS 21.0. Pengembangan set marka untuk identifikasi varietas berdasarkan gabungan metode sebelumnya (Song *et al.* 1999; Risliawati *et al.* 2015).

Selanjutnya jumlah grup dan selang grup ditentukan untuk tiap marka SSR. Jumlah grup dibuat berdasarkan jumlah pengulangan motif SSR. Sebagai contoh, Satt308 yang mempunyai motif "(ATT)", maka jumlah kelas akan ditentukan

berdasar jumlah motif alel yang dideteksi. Sementara, selang grup mewakili selang ukuran alel dalam tiap

$$\text{Selang grup} = \frac{\text{ukuran alel maksimum} - \text{ukuran alel minimum}}{\text{jumlah pengulangan motif marka SSR yang diobservasi}}$$

grup dan ditentukan berdasarkan formula

Langkah terakhir adalah mentransformasi ukuran alel ke kode angka sesuai dengan jumlah koding grup masing-masing 2 kode angka numerikal yang dimulai dari "00" untuk tiap motif SSR yang diobservasi dari tiap primer. Transformasi ini dilakukan untuk semua marka SSR dalam satu set marka yang diformulasi dan hasil koding merupakan ID tiap varietas.

HASIL

Analisis Polimorfisme dan Alel SSR

Hasil *allele calling* dan pengelompokan (*binning*) dari 29 varietas kedelai yang dianalisis dengan 9 marka SSR, memiliki karakteristik seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. Total alel yang terdeteksi diantara 29 varietas lokal kedelai adalah sebanyak 50 alel dengan kisaran 4-9 alel tiap lokusnya masing-masing untuk Satt038 dan Satt308.

Frekuensi alel dominan (>30%) ditemukan pada 9 lokus dengan nilai tertinggi pada Satt147 (frekuensi 75.86%). Hampir 51% total varietas berbagi alel umum/dominan. Sebanyak 38% (19 alel) dari seluruh alel dalam koleksi merupakan alel jarang. Satt308 yang menghasilkan paling banyak alel hanya sekitar 9 alel umum yang terdeteksi.

Tabel 2. Karakteristik alel yang diperoleh dari analisis sidik jari DNA dengan marka SSR pada 29 varietas lokal kedelai.

Marka	Kromosom	Jumlah alel	Frekuensi alel dominan ¹	Jumlah alel jarang ²	Gene diversity	PIC
Satt009	3	5	0,4483	1	0,7015	0,657
Satt038	18	4	0,4483	0	0,692	0,6422
Satt114	13	5	0,4828	2	0,6159	0,5435
Satt147	1	6	0,7586	3	0,4078	0,3885
Satt177	8	5	0,5862	2	0,5939	0,549
Satt242	9	7	0,4138	4	0,6801	0,6246
Satt243	10	4	0,5172	1	0,6159	0,5496
Satt308	7	9	0,3276	4	0,7776	0,7462
Satt414	16	5	0,5862	2	0,5731	0,5148

¹Alel dominan: alel dengan frekuensi >0,3; ²Alel jarang: alel dengan frekuensi <0,05 yang diobservasi pada total varietas

Tabel 3. Alel spesifik yang dideteksi pada koleksi varietas lokal kedelai dalam studi ini.

No	No. register	Nama	Lokus SSR (ukuran alel spesifik dalam bp)
1	4283	Singgalang (II)	Satt177 (105bp), Satt243 (273bp)
2	1635	Kedele Presi	Satt414 (268bp)
3	4042	Lokal Sukamandi (GM 4476Si)	Satt114 (98bp)
4	4299	Lokal Bogor	Satt147 (207/282bp)
5	3705	Lokal Kr Asem	Satt114 (111bp)
6	1459	Samarinda (I)	Satt147 (210bp)
7	3657	Lokal Jember	Satt308 (157bp)
8	3293	Genjah Hitam	Satt242 (136/154bp)
9	3660	Lokal Lumajang	Satt308 (151/172bp)
10	1658	Sopeng	Satt242 (130bp)
11	3692	Lokal Badung	Satt147 (213/327bp), Satt414 (313bp)
12	3900	LB-72	Satt009 (219bp)
13	4194	Lokal Ongko	Satt177(117bp), Satt242 (145/160bp)
14	3494	Papak	Satt242 (148bp), Satt308 (142bp)
15	3728	Kedele Hibrida	Satt308 (133/154bp)

Dalam koleksi varietas lokal ini, semua alel jarang merupakan alel spesifik pada varietas lokal tertentu. Total 15 varietas memiliki alel spesifik dengan kisaran satu sampai dua lokus. Khusus lokus Satt242 dan Satt308 menghasilkan paling banyak alel spesifik pada koleksi varietas lokal tersebut (Tabel 3).

Parameter lain yang menentukan tingkat polimorfisme marka molekuler adalah nilai PIC (*Polymorphism Information Content*). Rataan nilai PIC untuk total varietas kedelai sekitar 0,58. Dari 9 marka SSR yang digunakan, satu marka memiliki nilai PIC cukup tinggi ($> 0,7$), yaitu lokus Satt308. Tiga marka memiliki nilai PIC sedang yaitu Satt009, Satt038, dan Satt242, dan PIC terendah pada Satt147. Adapun tingkat keragaman genetik dari plasma nutfah yang diamati dapat ditunjukkan oleh nilai *gene diversity*/keragaman genetik. Dalam penelitian ini, rata-rata nilai keragaman genetik cukup tinggi yaitu 0.63.

Pengembangan Set Marka SSR dan ID Varietas

Dalam studi ini beberapa tahap dalam merancang set marka untuk identifikasi varietas, meliputi seleksi kandidat marka, menentukan metode rancangan set marka, perancangan set marka, dan penyusunan identitas (ID) varietas. Berdasarkan nilai PIC, indek keragaman genetik, jumlah alel jarang, estimasi jarak genetik, pada awalnya dipilih 5 marka

dari 9 marka sebagai set marka dasar, yaitu Satt308, Satt009, Satt242, Satt038 dan Satt177. Berdasarkan analisis filogeni dengan lima marka terpilih (Satt009-Satt038-Satt177-Satt242-Satt308), sebagian besar (24 varietas) dapat terpisah dalam sub kluster. Namun terdapat dua kelompok yang terdiri dari 3 varietas (No.1. Lokal Sumbar, 4. Hitam Lokal, dan 18. Kc Duduk) dan 2 varietas (No.10. Lokal Karangasem, 11. Samarinda) yang tiap varietas dalam kelompok belum dapat dibedakan. Anggota dari dua kelompok ini bila dilihat satu sama lain, dekat jarak genetiknya pada dendrogram (Gambar 1). Sedangkan 9 marka sekalipun belum dapat membedakan Lokal Sumbar, Hitam Lokal, dan Kc Duduk. Untuk varietas Lokal Karangasem dan Samarinda, ketika ditambahkan satu marka sebagai pembeda yaitu Satt114, keduanya memberikan ukuran alel dan koding alel yang berbeda.

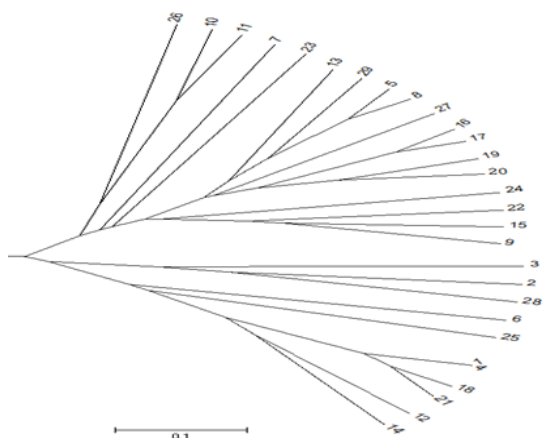
Mengingat profil sidik jari sebagai identitas diformulasikan sebagai “koding” dalam angka numerik, maka rancangan berdasarkan hasil deteksi fragmen dengan *Genetic Analyzer* menjadi prioritas dalam studi ini. Pembentukan kelas dengan kode khusus dua digit mewakili tiap selang ukuran alel dari masing-masing lokus yang dihitung dengan rumus tertentu seperti tertera di metode (Tabel 4). Berdasarkan jumlah total motif yang terdeteksi, koding 00-08 dari ukuran terkecil sampai terbesar

untuk 6 lokus SSR. Tiap marka memiliki jumlah kelas koding misalnya Satt009 dan Satt177 ada 5 koding, sementara Satt242 dan Satt308 masing-masing menghasilkan 7 dan 9 koding. Khusus Satt114 sebagai marka identifier ada 5 koding.

Koding varietas dengan set marka merupakan upaya memberikan identitas bagi varietas untuk dapat dibedakan secara genetik dengan sistem digital. Sebagai contoh, marka Satt009 mendeteksi 5 alel dengan kisaran 174 – 223, sehingga akan terdapat 5 kode kuantitatif yang merupakan representasi ukuran alel hasil amplifikasi DNA oleh marka yang dimaksud dengan catatan semua alelnya homozigot. Teknik koding seperti ini dilakukan pada semua marka SSR dalam set marka identitas. Secara keseluruhan, hasil koding varietas lokal kedelai

Indonesia menggunakan set marka identitas ditunjukkan pada Tabel 5.

Kode ID tiap varietas ada 12 digit berdasarkan transformasi ukuran alel 6 lokus SSR. Sebagai contoh varietas Singgalang (II) mempunyai ukuran alel 180, 178, 105, 154, 133 dan 116 bp secara berurutan untuk lokus Satt009, Satt038, Satt177, Satt242, Satt308 dan Satt114. Berdasarkan transformasi ke sistem digital dari Tabel 4 maka akan dikodekan 00, 01,00,04,00,04 untuk tiap lokus SSR dari set marka. Dengan demikian ID Singgalang (II) adalah 000100040004. Prosedur yang sama diterapkan untuk pembuatan ID varietas lainnya. Tiga varietas yang tidak diketahui asal usulnya, Papak, Presi dan kedelai hibrida sudah memiliki ID. ID tersebut akan sangat bermanfaat dalam menelusuri asal usul dan kemurnian benih varietas/aksesi tersebut. Namun karena 3 varietas (Lokal Sumbar, Hitam lokal dan Kc Duduk) belum dapat dibedakan dengan set marka ini, sehingga ketiga varietas tersebut masih memiliki ID sama yaitu 000002030700. Karena itu perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut untuk mencari marka SSR identifier khusus ketiga varietas tersebut.



Gambar 1. Dendrogram 29 varietas lokal kedelai berdasarkan profil sidik jari DNA yang dihasilkan 5 marka SSR terpilih.

PEMBAHASAN

Tingkat polimorfisme tiap dan total primer SSR cukup tinggi dalam koleksi plasma nutfah yang hampir semua adalah varietas lokal dalam studi ini. Namun jumlah alel yang terdeteksi dalam koleksi di studi ini lebih rendah pada hasil laporan sebelumnya karena menggunakan jumlah varietas lebih banyak dan varietas lokal lebih variatif termasuk varietas

Tabel 4. Kode untuk setiap selang ukuran alel yang diformulasikan untuk 6 marka SSR sebagai kandidat set marka dan satu identifier (Mi) untuk identifikasi varietas lokal kedelai.

Koding	Kisaran Alel					
	Satt009	Satt038	Satt177	Satt242	Satt308	Satt114 (Mi)
00	174-183	172-177	101-105	130-134	133-137	95-99
01	184-193	178-183	106-110	135-139	138-142	101-104
02	194-203	184-189	111-115	140-144	143-147	105-109
03	204-213	190-195	116-120	145-149	148-152	110-114
04	214-223		121-125	150-154	153-157	115-119
05				155-159	158-162	
06				160-164	163-167	
07					168-172	
08					173-183	

Tabel 5. Identitas spesifik (ID) varietas lokal kedelai yang dikembangkan berdasarkan profil sidik jari dari set marka yang terdiri dari enam lokus SSR.

No	No. register	Nama	Asal		Kode ID
			Kabupaten	Propinsi	
1	1670	Lokal Sumbar	Sumbar	Sumbar	000002030700
2	4283	Singgalang (II)	Singgalang	Sumbar	000100040004
3	1635	Kedele Presi	Lampung	Lampung	000101040400
4	3184	Hitam Lokal	Sukamandi	Jabar	000002030700
5	3233	Ked kecipir putih	Sukamandi	Jabar	000002040304
6	4042	Lokal Sukamandi (GM 4476Si)	Subang	Jabar	000302040400
7	4299	Lokal Bogor	Bogor	Jabar	000302040704
8	887	Genjah Slawi	Tegal	Jateng	000002030304
9	3702	Lokal Karang asem (I)	Karangasem	Jateng	000302040302
10	3705	Lokal Kr Asem	Karangasem	Jateng	000001030303
11	1459	Samarinda (I)	Jember	Jatim	000001030304
12	3490	Hitam	Jember	Jatim	000001040300
13	3657	Lokal Jember	Jember	Jatim	000102030404
14	3293	Genjah Hitam	Kediri	Jatim	000002010300
15	3506	Lokal Kediri	Kediri	Jatim	000002040402
16	3610	Lokal Kediri	Kediri	Jatim	000102040704
17	3611	Lokal Kediri	Kediri	Jatim	000102040304
18	3594	Lokal Magetan	Magetan	Jatim	000001030700
19	3601	Lokal Ponorogo	Ponorogo	Jatim	000002040704
20	3660	Lokal Lumajang	Lumajang	Jatim	000002040304
21	961	Kc. Duduk	Kutai	Kaltim	000002030700
22	1658	Sopeng	Sopeng	Sulsel	000002000300
23	3692	Lokal Badung	Badung	Bali	000102030404
24	3695	Lokal Tabanan	Tabanan	Bali	000002040700
25	3900	LB-72	Bali	Bali	040002040700
26	4194	Lokal Ongko	Ongko	NTB	000003060404
27	3494	Papak	Unknown	Unknown	000002030104
28	3661	Presi	Unknown	Unknown	000102040000
29	3728	Kedele Hibrida	Unknown	Unknown	000302030004

*Koding varietas berdasarkan profil sidik jari yang dihasilkan marka SSR dari kiri ke kanan tiap 2 digit: Satt009-Satt038-Satt177-Satt242-Satt308-Satt114

unggul dan introduksi pada laporan sebelumnya (Maughan *et al.* 1995; Chaerani *et al.* 2011). Hal tersebut sesuai dengan analisis Wang *et al.* (2005) bahwa peningkatan jumlah varietas biasanya diikuti dengan peningkatan jumlah alel.

Terkait dengan keberadaan frekuensi alel, khususnya alel jarang dan marka yang tidak dapat mendeteksi alel jarang tidak disarankan menjadi kandidat calon set marka identifikasi karena akan sulit memberi penciri spesifik bagi plasma nutfah yang bersangkutan (Luce *et al.* 2001). Kasus ini

dideteksi pada lokus Satt038 yang tidak memiliki alel jarang. Sementara Satt308 yang menghasilkan paling banyak alel umum dalam koleksi varietas lokal ini, ternyata ada 4 alel jarang yang terdeteksi. Analisis jumlah alel per lokus berkorelasi positif dengan jumlah alel jarang namun negatif dengan alel dominan. Kecenderungan tersebut mendukung hasil korelasi pada plasma nutfah kedelai sebelumnya (Jain *et al.* 2004; Santoso *et al.* 2006; Chaerani *et al.* 2011) dan penting dalam keberhasilan pengembangan marka untuk penciri varietas..

Sebagian besar alel jarang adalah alel spesifik yang dimiliki oleh varietas tertentu dan umumnya banyak ditemukan pada varietas lokal (Chaerani *et al.* 2011). Alel-alel spesifik/jarang tersebut dapat terkait karakter morfo-agronomi penting karena proses adaptasi maupun ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik (Narvel *et al.* 2000) dan memperkaya keragaman genetik yang penting untuk keefektifan pemanfaatan dan pengelolaan plasma nutfah (Li *et al.* 2009). Kemunculan alel jarang dan spesifik banyak dipengaruhi oleh lingkungan (Diwan & Cregan 1997) yang mungkin banyak berkontribusi pada varietas lokal kedelai yang tersebar di Indonesia. Alel-alel spesifik berkontribusi menjadi sumber penciri spesifik genetik pada varietas lokal sebagai indikasi proteksi asal geografinya (Jain *et al.* 2004; Prohens *et al.* 2008).

PIC berkorelasi positif dengan jumlah alel ($r=0,98$, $p<0,001$) yang relevan dengan penelitian sebelumnya (Narvel *et al.* 2000). Rataan nilai PIC (0,58) masih sebanding dengan hasil Chaerani *et al.* (2011) meskipun menggunakan hampir dua kali lipat plasma nutfah (PIC: 0,58) namun lebih rendah dari hasil lainnya yang diversitas dan jumlah varietas lokalnya lebih tinggi (Santoso *et al.* 2006; Liu *et al.* 2011). Perbedaan keragaman berdasarkan PIC dalam studi ini menunjukkan bahwa pilihan marka dan varietas yang dianalisis berpengaruh terhadap variasi nilai keragaman marka molekuler. Marka dengan PIC tinggi dan informatif dapat dijadikan kandidat set marka identifikasi. Kombinasi marka informatif dan kurang informatif ternyata disarankan untuk dijadikan set marka analisis sidik jari DNA untuk identifikasi dan diferensiasi varietas (Bredemeijer *et al.* 2002).

Dalam penelitian ini, rata-rata nilai keragaman genetik cukup tinggi (0,63), tidak berbeda jauh dengan keragaman genetik dari sekitar 260 varietas lokal Korea, 0,615 dengan 92 SSR (Cho *et al.* 2008). Namun nilai keragaman genetik dalam studi ini lebih rendah daripada dalam koleksi kedelai yang mayoritas dari Indonesia (Santoso *et al.* 2006) dan plasma nutfah dari Cina dengan 40 varietas dan 40 SSR (Min *et al.* 2010) maupun koleksi kedelai dari Brazil (Mulato *et al.* 2010). Plasma nutfah yang dilaporkan peneliti lain tersebut lebih tinggi diversitasnya (lokal, introduksi, varietas unggul, varietas liar). Hal ini menandakan bahwa pemilihan materi genetik untuk penelitian ini sudah cukup baik karena besarnya keragaman genetik materi plasma

nutfah yang diuji akan menentukan tingkat polimorfisme marka SSR yang dipakai. Kecuali itu, tujuan aplikasi marka dalam studi ini adalah untuk identifikasi varietas, sehingga jumlah dan variasi koleksi sudah cukup mewakili untuk dianalisis.

Sebuah set marka molekuler dikatakan ampuh dalam identifikasi varietas apabila mampu menghasilkan profil sidik jari DNA yang spesifik untuk tiap varietas target. Jumlah marka dalam formulasi untuk identitas dan proteksi varietas seharusnya minimal tetapi efisien (Ritschel *et al.* 2004), dan ada beberapa metode yang digunakan seperti multivariasi (Song *et al.* 1999) dan algoritma genetik (Jones *et al.* 2010). Dalam studi ini, set marka dirancang berdasarkan ukuran alel asli yang diobservasi dan kualitas tampilan kromatogram. Ukuran alel asli dapat ditampilkan secara kualitatif berupa pola pita DNA hasil elektroferesis, dan kuantitatif dalam angka numerik hasil deteksi fragmen SSR oleh *Genetic Analyzer*. Setelah set marka dengan jumlah minimal namun mempunyai kemampuan diferensiasi diperoleh dan ternyata masih ada varietas dengan kesamaan genetik, seperti terjadi antara 3 varietas lokal (Lokal Sumbar, Hitam Lokal dan Kc Duduk), maka diperlukan marka pembeda. Marka seperti ini dapat disebut sebagai marka identifier. Solusi identifier ini mirip dengan kasus dalam membedakan dua varietas tomat dengan tambahan dua lokus yang tadinya tidak dapat dibedakan diantara 500-an varietas komersial yang dianalisis dengan 20 marka SSR (Bredemeijer *et al.* 2000).

Varietas-varietas lokal yang memiliki ID khusus akan banyak sekali manfaatnya termasuk dalam memecahkan duplikasi varietas karena salah pelabelan, pencampuran benih selama prosesing (Chaerani *et al.* 2011; Lestari *et al.* 2012), membantu memisahkan varietas-varietas yang mempunyai keidentikan nama dan fenotip (Santoso *et al.* 2006), ataupun varietas lokal superior yang perlu diproteksi sesuai karakter fenotipnya (Prohens *et al.* 2008). Beberapa varietas lokal dengan nama sama namun dari daerah yang berbeda atau mungkin sebenarnya varietas yang sama namun penamaan yang berbeda sesuai daerah, akan dapat ditelusuri melalui ID genetik ini. ID ini juga membantu jika suatu saat varietas lokal ini karena karakter morfo-agronomi yang unggul akhirnya diputihkan untuk dilepas, maka identitas genetik sudah tersedia. Informasi ID varietas lokal kedelai Indonesia tersebut akan

berguna sebagai referensi yang diakomodir dalam database yang melengkapi data fenotip untuk membantu pengelolaan plasma nutfah kedelai.

Dengan demikian set marka sangat bermanfaat untuk mendapatkan sidik jari genetik varietas lokal yang dapat diidentifikasi secara spesifik dan terpisah dari sub klaster varietas lokal lainnya yang akhirnya mengarahkan pemanfaatannya sehubungan dengan indikasi geografi dan asal usulnya. Sistem koding digital sebagai identitas genetik varietas lokal kedelai Indonesia dalam studi ini melengkapi sistem koding sebelumnya seperti di Jepang yang bertujuan untuk memproteksi padi premium Koshihikari dari pemalsuan meskipun dengan pendekatan lain (Ohtsubo *et al.* 2007). Pengembangan set marka tidak hanya diaplikasikan di kedelai komersial dan varietas elit (Song *et al.* 1999) namun juga pada spesies tanaman lain seperti varietas terong lokal (Prohens *et al.* 2008), tomat (Bredemeijer *et al.* 2002), tebu (Hameed *et al.* 2012) dan lainnya. Susunan set marka identitas kemungkinan akan berubah sejalan dengan penambahan varietas, namun metode dan teknik yang digunakan dalam mengembangkan set marka identitas dapat diaplikasikan secara konsisten. Pengembangan ID kedelai lokal dalam studi ini dapat diterapkan di Indonesia, terutama untuk melindungi plasma nutfah lokal pencitra daerah tertentu di Indonesia.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis polimorfisme dan kluster, sebuah set marka telah diformulasi untuk identifikasi varietas kedelai lokal Indonesia. Set marka identitas terdiri atas enam lokus SSR yaitu Satt009-Satt038-Satt177-Satt242-Satt308-Satt114 yang berhasil mendiferensiasi dengan keberhasilan 90% dari total 29 varietas. 26 varietas lokal kedelai telah memiliki ID genetik dalam 12 digit secara spesifik tiap varietas. Identitas spesifik/ID ini melengkapi karakter spesifik morfologi untuk perlindungan varietas lokal dengan status asal geografi yang penting dalam pengembangan pertanian kedelai ke depannya.

DAFTAR PUSTAKA

Bredemeijer, M., J. Cooke, W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, Y. Noordijk, S. Rendell, J. Jackson, S. Roder, K. Wendehake, M. Dijcks, M. Amelaine, V. Wickaert, L. Bertrand, & B.

- Vosman. 2002. Construction and testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 105: 1019-1026.
- Cahyarini, RD., A. Yunus, & E. Purwanto. 2004. Identifikasi keragaman genetik beberapa varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isozim. *Agrosains*. 6: 79-83.
- Chaerani, N. Hidayatun, & DW. Utami. 2009. Pengembangan set multipleks penanda DNA mikrosatelit untuk analisis variasi genetik padi dan kedelai. *Jurnal Agrobiogen*. 5: 57-64.
- Chaerani, N. Hidayatun, & DW. Utami. 2011. Keragaman genetik 50 varietas plasma nutfah kedelai berdasarkan 10 penanda mikrosatelit. *Jurnal Agrobiogen*. 7: 96-105.
- Cho, GT., J. Lee, JK. Moon, MS. Yoon, HJ. Baek, JH. Kang, & NC. Paek. 2008. Genetic diversity and population structure of Korean soybean landrace (*Glycine max* (L.) Merr.) *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 11: 83-90.
- Commission of the European Communities. 2006. Council Regulation (EC) No. 509/2006 of 20 March 2006 on the protection of geographical indications and designations of origin for agricultural products and foodstuffs, Official Journal of the European Union L93:12-25.
- Diwan, N. & PB. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 723-733.
- Ghosh, J., PD. Ghosh, & PR. Choudhury. 2014. An assessment of genetic relatedness between soybean cultivars using SSR markers. *American Journal of Plant Sciences*. 5: 3089-3096.
- Hameed, U., YB. Pan, K. Muhammad, S. Afghan, & J. Iqbal. 2012. Use of simple sequence repeat markers for DNA fingerprinting and diversity analysis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar resistant and susceptible to red rot. *Genetics and Molecular Research*. 11: 1195-1204.
- Heckenberger, M., M. Bohn, JS. Ziegler, LK. Joe, JD. Hauser, M. Hutton, & A. Melchinger. 2002. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties. I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. *Molecular*

- Breeding*. 10: 181-191.
- Henry, RJ. 2001. *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI Publishing, UK.
- Jain, S., RK. Jain, & SR. McCouch. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently labeled microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 965-977.
- Jeffreys, AJ., V. Wilson, & SL. Thein. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature*. 316: 76-79.
- Jones, L., S. Wall, B. Nelson, & S. Smith. 2010. *Varietas identification in maize are sixteen SNP markers sufficient? Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA Profiling in Particular*. Ottawa, Canada.
- Keim, O., T. Olson, & R. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter*. 15: 150-152.
- Lestari, P., A. Risliawati, & HJ. Koh. 2012. Identifikasi dan aplikasi marka berbasis PCR untuk identifikasi varietas padi dengan palatabilitas tinggi. *Jurnal Agrobiogen*. 8: 69-77.
- Li, Y., R. Guan, Z. Liu, Y. Ma, L. Wang, L. Li, F. Lin, W. Luan, P. Chen, Z. Yan, Y. Guan, L. Zhu, X. Ning, MJ. Smulders, W. Li, R. Piao, Y. Cui, Z. Yu, M. Guan, R. Xhang, A. Hou, A. Shi, B. Zhang, S. Zhu, & L. Qiu. 2009. Genetic structure and diversity of cultivated soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) landraces in China. *Theoretical and Applied Genetics*. 117: 857-871.
- Liu, M., M. Zhang, W. Jiang, G. Sun, H. Zhao, & S. Hu. 2011. Genetic diversity of Shaanxi soybean landraces based on agronomic traits and SSR markers. *African Journal of Biotechnology*. 10: 4823-4837.
- Luce, C., JL. Noyer, D. Tharreau, N. Ahmadi, & H. Feyt. 2001. The use of microsatellite markers to examine the diversity of the genetic resources of rice (*Oryza sativa*) adapted to European condition. *Acta Horticulturae*. 546: 221-235.
- Maughan, PJ., MAS. Maroof, & RG. Buss. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*. 38: 715-723.
- Min, W., RZ. Li, WM. Yang, & WJ. Du. 2010. Assessing the genetic diversity of cultivars and wild soybeans using SSR markers. *African Journal of Biotechnology*. 9: 4857-4866.
- Monden, Y., A. Yamamoto, A. Shindo, & M. Tahara. 2014. Efficient DNA fingerprinting based on the targeted sequencing of active retrotransposon insertion sites using a bench-top high-throughput sequencing platform. *DNA Research*. 21: 491-498.
- Mulato, BM., M. Moller, MI. Zucchi, V. Quecini, & JB Pinheiro. 2010. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 45: 276-283.
- Narvel, JM., W. Chu, WR. Fehr, PB. Cregan, & RC. Shoemaker. 2000. Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Molecular Breeding*. 6: 175-183.
- Ohtsubo, KI & S. Nakamura. 2007. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymorphism chain reaction method and its application to processed rice products. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 55: 1501-1509.
- Pan, YB., JD. Miller, RJ. Schnell, & J Richard. 2003. Application of microsatellite and RAPD fingerprints in the Florida sugarcane variety program. *Sugar Cane International* March/April, 19-28.
- Pan, YB., BS. Scheffler, & JEP. Richard. 2007. High-throughput genotyping of commercial sugarcane clones with microsatellite (SSR) DNA markers. *Sugar Technology*. 9: 176-181.
- Prohens, J., JE. Munoz-Falcon, S. Vilanova, & F. Nuez. 2008. Use of molecular markers for the enhancement of local varieties of vegetables for protected designations of origin dan geographical indications. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*. 65: 16-20.
- Risliawati, A., EI. Riyanti, P. Lestari, DW. Utami, & TS. Silitonga. 2015. Development of SSR marker set to identify forty two Indonesian soybean varieties. *Jurnal Agrobiogen*. 11 (2): 49-58
- Ritschel, PS., TC. de Lima Lins, RL. Tristan, GSC. Buso, JA. Buso, & ME. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from

- an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology*. 4: 9.
- Rongwen, J., MS. Akaya, AA. Bhagwat, U. Lavi, & PB. Cregan. 1995. The use of microsatellites DNA markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics*. 90: 43-48.
- Santoso, TJ., DW. Utami, & E. Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal Agrobiogen*. 29: 1-7.
- Saad, R. 2004. Discovery, development and current application DNA identity testing. *BUMC Proceedings*. 18:130-133.
- Sharopova, N., MD. McMullen, L. Schultz, S. Schroeder, H. Sanchez-Villeda, J. Gardiner, D. Bergstrom, K. Houchins, S. Melia-Hancock, T. Musket,, N. Duru, M. Polacco, K. Edwards, T. Ruff, JC. Register, C. Brouwer, R. Thompson, R. Velasco, E. Chin, M. Lee, W. Woodman-Clikeman, MJ. Long, E. Liscum, K. Cone, G. Davis, & EH Jr. Coe. 2002. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Molecular and Biology*. 48: 463-481.
- Silva, J. & J. Bressiani. 2005. Sucrose synthase molecular marker associated with sugar content in elite sugarcane progeny. *Genetics and Molecular Biology*. 28: 294-298.
- Singh, RK., VS. Btatia, KV. Bhat, T. Mohapatra, NK. Singh, KC. Bansal, & KR. Koundal. 2010. SSR and AFLP based genetic diversity of soybean germplasm differing in photoperiod sensitivity. *Genetics and Molecular Biology*. 33: 319-324.
- Song, QJ., CV. Quigley, RL. Nelson, TE. Carter, HR. Boerma, JL. Strachan, & PB. Cregan. 1999. A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. *Plant Varieties and Seeds*. 12: 207-220.
- Sumarno, Z., C. Arifin, S. Ismail, S. Nurbanah, & N. Pangarso. 1998. *Rakitan teknologi budi daya kedelai*. Monograf Rakitan Teknologi. BPTP Karangploso, Malang. 37-68.
- Tantasawat, P., J. Trongchuen, T. Prajongjai, S. Jenweenrawat, & W. Chaowiset. 2011. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and varietal identification in Thailand. *Australian Journal of Crop Science*. 5: 283-290.
- Thomson, MJ. 2004. *Microsatellite fragment Sizing on the CEQ 8000: BB-Biogen Standard Operating Procedure Series: 1-10*. Bogor: Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development.
- Wang, L., R. Guan, L. Zhangdong, R. Chang, & L. Qiu. 2005. Genetic diversity of classic cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sciences*. 46:1032-1038.
- Zhu, YF., GC. Qin, J. Hu, Y. Wang, JC. Wang, & SJ. Zhu. 2012. Fingerprinting and variety identification of rice (*Oryza sativa* L.) based on simple sequence repeat markers. *Plant Omics Journal*. 5: 421-426.

Lestari dkk.