

PENGEMBANGAN SIDIK JARI DNA KLON KARET IRR SERI 400 BERDASARKAN MARKA SSR

DNA Fingerprinting Development of Rubber Clones IRR 400 series Based on SSR Marker

Fetrina OKTAVIA*

Pusat Penelitian Karet, Jalan Raya Palembang – Pangkalan Balai Km. 29,
Sembawa, Banyuasin, Sumatera Selatan

*e-mail : fetrina_oktavia@yahoo.com

Diterima: Juni 2025/Disetujui: Oktober 2025

Abstract

Development of rubber plantation area to non traditional area is the challenges for breeder to obtain the new superior clones that high latex yielding and suitable to certain agroclimate condition. IRR 400 series clone is one of new rubber superior clones which on the adaptation trial and in preparation to release to planters. In order to prepare and to distribute these clone are needed preparation of purity the budwood garden and it had been identified by morphology and molecular method. Improvement of accurate rubber clones identification by molecular method is necessary to maintain the purity of budwood garden and genetic quality of rubber clone. The study aimed to analyze DNA fingerprints of 10 rubber clone of IRR 400 series in order to make clone specific characteristics by using 10 selected SSR (Simple Sequence Repeat) primers. The results of PCR amplification of 10 SSR loci in 10 clones produced 53 alleles with an average of 5.3 alleles per locus. Based on visual analysis of the allele position scoring of each locus, 33 clone-specific markers were successfully identified with 2-6 markers in each clone. These clone-specific markers can be used as a set of DNA markers for the identification of 10 IRR clones of the 400 series and the development of a database that is useful for the management and protection of Indonesian rubber germplasm from theft and claims by foreign parties.

Keywords: Budwood; clone purification; *Hevea brasiliensis*; microsatellite; specific allele.

Abstrak

Pengembangan areal perkebunan karet ke daerah non tradisional merupakan tantangan bagi pemulia untuk menghasilkan klon-klon karet unggul baru berproduksi tinggi dan sesuai dengan kondisi agroklimat tertentu. IRR seri 400 merupakan salah satu seri klon karet unggul baru yang sedang dalam tahap uji adaptasi dan persiapan pelepasan ke masyarakat. Dalam rangka persiapan dan penyebaran klon karet unggul baru tersebut diperlukan penyiapan kebun entres yang murni secara morfologi dan molekuler. Pengembangan metode identifikasi klon karet secara akurat melalui molekuler perlu dilakukan untuk menjaga kemurnian kebun entres dalam upaya menjaga mutu genetik dari suatu klon. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sidik jari DNA 10 klon karet IRR seri 400 sebagai penanda genetik setiap klon menggunakan 10 primer SSR (Simple Sequence Repeat). Hasil amplifikasi PCR 10 lokus SSR pada 10 klon menghasilkan 53 alel dengan rata-rata 5,3 alel per lokus. Berdasarkan analisis visual skoring posisi alel masing-masing lokus berhasil diidentifikasi 33 marka spesifik klon dengan 2-6 marka pada masing-masing klon. Marka spesifik klon tersebut dapat digunakan sebagai set marka DNA penciri untuk identifikasi 10 klon IRR seri 400 serta pengembangan database yang berguna untuk pengelolaan dan perlindungan plasma nutfah karet Indonesia dari pencurian dan klaim pihak asing.

Kata kunci: Entres; pemurnian klon; *Hevea brasiliensis*; mikrosatelit; alel spesifik

PENDAHULUAN

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang bernilai ekonomi tinggi dan sumber devisa negara. Seiring dengan pengembangan areal perkebunan karet ke daerah sub optimal seperti lahan gambut dan beriklim kering, maka permintaan bibit karet juga terus meningkat. Hal ini merupakan tantangan bagi Pusat Penelitian Karet sebagai lembaga penelitian untuk menghasilkan klon-klon unggul baru yang memiliki kesesuaian dengan berbagai kondisi agroklimat di lahan sub optimal.

Pusat Penelitian Karet sedang melakukan pengujian adaptabilitas 10 klon unggul harapan baru IRR seri 400 di berbagai kondisi agroklimat. Sebagai persiapan pelepasan klon unggul baru, perlu dilakukan karakterisasi ciri-ciri masing-masing klon baik berdasarkan karakter morfologi maupun sidik jari DNA. Karakterisasi tersebut diperlukan sebagai untuk mendapat penanda untuk masing-masing klon sehingga dapat dibedakan dengan klon karet lainnya. Adanya penanda spesifik klon tersebut merupakan salah satu solusi penting dalam menghadapi adanya permasalahan kesalahan penggunaan klon dalam penyebaran klon-klon karet unggul baru di masyarakat. Kesalahan tersebut sering terjadi karena kemiripan morfologi antar klon karet yang sangat tinggi sehingga susah untuk dibedakan. Kesalahan penggunaan klon akan sangat berpengaruh terhadap produktivitas kebun, dimana potensi produksi klon tidak akan tercapai. Kesalahan penyebaran klon karet ini tidak hanya dialami Indonesia, tapi juga di negara penghasil karet lainnya (IRRDB, 2019). Tidak hanya pada karet, kesalahan identitas klon juga sudah dilaporkan pada tanaman lain, seperti pada kakao (*Theobroma cacao*) (Takrama *et al.*, 2012; Livingstone *et al.*, 2012) di mana beberapa studi mengklaim mendeteksi hingga 45% bahan tanam salah klon.

Penggunaan kebun entres yang murni dan benar merupakan salah satu syarat dalam menghasilkan klon unggul baru. Dalam proses pemurnianan klon di kebun entres dan di lapangan seringkali mengalami kesulitan dalam membedakan suatu klon dengan klon lainnya karena kemiripan morfologi klon yang tinggi. Selain

itu keterbatasan tenaga ahli yang mampu mengidentifikasi klon secara morfologi juga menjadi salah satu faktor pembatas dalam proses pemurnian kebun entres. Salah satu solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan memanfaatkan perkembangan teknologi sidik jari DNA (DNA *fingerprinting*).

Sidik jari DNA dapat dihasilkan menggunakan berbagai marka molekuler berdasarkan amplifikasi PCR seperti molekuler *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Blair *et al.*, 1999; Bredemeijer *et al.*, 2002), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) (Liu dan Furnier 1993), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (William *et al.*, 1990), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Vos *et al.*, 1995; Suparningtyas *et al.*, 2018) dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Greenhill *et al.*, 2018). Masing-masing teknik tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan. Oleh karena itu pemilihan teknik seringkali dilakukan dengan mempertimbangkan berbagai faktor seperti aplikasi yang diinginkan (DNA *genotyping* atau pemetaan genetik), organisme yang akan diteliti (hewan, tanaman, atau manusia), marka yang diperlukan (dominan atau kodominan), serta kesediaan dana dan kemampuan teknis untuk melaksanakan teknologi tersebut.

Salah satu marka molekuler yang telah digunakan secara luas adalah SSR (*Simple Sequence Repeat*) atau mikrosatelit. Marka SSR merupakan *tandem arrays* dari 2-5 pasangan basa nukleotida berulang yang ditemukan secara luas pada organisme Eukariota. Secara teknis SSR relatif sederhana, *reproduksibel*, *repeatable*, bersifat kodominan dan multi alelik, melingkupi daerah genom yang luas serta pada umumnya bersifat polimorfik (Saha *et al.*, 2005; Aggarwal *et al.*, 2007; Brantestam *et al.*, 2007; Gouvea *et al.*, 2010). Aplikasi marka SSR pada tanaman karet telah dilaporkan oleh berbagai peneliti (Feng *et al.*, 2009; Pootakham *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2011; Budiani *et al.*, 2014). Marka tersebut digunakan untuk berbagai tujuan seperti analisis keragaman genetik dan identifikasi sidik jari DNA.

Karakterisasi plasma nutfah karet menggunakan marka molekuler memiliki berbagai kelebihan seperti dapat memberikan hasil yang lebih cepat, tepat dan akurat dibandingkan dengan

karakterisasi berdasarkan karakter morfologi. Karakterisasi menggunakan marka molekuler dapat dilakukan pada stadium awal, bahkan dapat dilakukan pada benih dan tidak bersifat merusak karena hanya membutuhkan sedikit sampel serta tidak bias oleh faktor lingkungan. Karakterisasi secara molekuler juga dapat digunakan bersama dan saling melengkapi dengan karakterisasi berdasarkan ciri-ciri morfologi. Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi sidik jari DNA berdasarkan marka molekuler SSR 10 klon IRR seri 400 sebagai penanda masing-masing klon dan *database* identitas klon yang dihasilkan oleh Pusat Penelitian Karet.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Pusat Penelitian Karet, Sembawa, Banyuasin, Sumatera Selatan pada tahun 2024. Sampel daun sebagai sumber materi genetik dari klon-klon yang dianalisis diambil dari Kebun Entres Koleksi Plasma Nutfah yang telah dimurnikan secara morfologi.

Metode Penelitian

Identifikasi sidik jari DNA dilakukan pada 10 klon karet IRR seri 400. Daftar klon dan informasi tetua masing-masing klon tercantum pada Tabel 1. Sepuluh primer SSR yang digunakan merupakan primer SSR dengan polimorfisme tinggi pada tanaman karet hasil seleksi 135 primer SSR (Oktavia *et al.*, 2017). Tabel 2 menunjukkan daftar primer SSR, urutan sekuen nukleotida dan suhu *annealing* masing-masing primer yang digunakan. Untuk mendeteksi pola alel pada masing-masing klon, dilakukan

elektroforesis gel akrilamid dan pewarnaan perak nitrat.

Pola sidik jari DNA masing-masing klon karet diamati secara visual pada gel akrilamid yang sudah diwarnai dengan silver nitrat. Tahapan kerja penelitian terdiri dari beberapa tahap yaitu:

1. Identifikasi kebenaran klon pohon sumber sampel secara morfologi dan pengambilan sampel daun.
2. Isolasi DNA sampel daun
3. Amplifikasi PCR dengan 10 primer SSR terpilih
4. Elektroforesis gel agarose dan akrilamid hasil PCR
5. Pewarnaan hasil elektroforesis dengan perak nitrat
6. Analisis keragaman genetik dan pola sidik jari DNA masing-masing klon.

Isolasi DNA Genomik

Pengambilan sampel daun untuk analisis DNA dilakukan pada plot yang telah murni berdasarkan karakter morfologi. DNA total sebagai *template* untuk analisis SSR diisolasi berdasarkan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) dengan beberapa modifikasi. Daun muda dari masing-masing aksesori digerus dengan penambahan 0,1 g PVPP dan nitrogen cair sampai dihasilkan serbuk daun yang halus. Selanjutnya serbuk dimasukkan ke dalam 5 ml buffer ekstraksi yang telah dipanaskan dan diberi -mercaptoethanol 1%, di vortex serta dipanaskan selama 30 menit pada suhu 65°C.

Sampel kemudian didinginkan pada suhu kamar, ditambahkan dengan 5 ml (24:1) chloroform:isoamilalkohol (CI) dan divortex. Sampel disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Cairan

Tabel 1. Daftar klon karet dan tetuanya

Table 1. List of rubber clones and their parents

| No No | Klon Clone | Tetua Parent | No No | Klon Clone | Tetua Parent |
|----------|---------------|--------------------|----------|---------------|--------------------|
| 1 | IRR 425 | IAN 873 X PN 20 | 6 | IRR 440 | IAN 873 x PN 7108 |
| 2 | IRR 428 | PB 260 X IRR 100 | 7 | IRR 449 | PB 260 X IRR 111 |
| 3 | IRR 429 | IRR 111 X PB 260 | 8 | IRR 450 | RRIM 600 X PB 5/51 |
| 4 | IRR 431 | IRR 111 X PB 260 | 9 | IRR 455 | PB 260 X PN 2018 |
| 5 | IRR 434 | IAN 873 X RRIC 100 | 10 | IRR 457 | RRIM 600 X IRR 111 |

Tabel 2. Daftar primer SSR, urutan sekuen, suhu annealing dan referensi masing-masing primer yang digunakan dalam penelitian

Table 2. List of SSR primers, sequence order, annealing temperature, and references of each primer used in experiment

| No | Nama Primer Name of primers | Urutan Sekuen Nukleotida (5' - 3') Nucleotide sequence order (5' – 3') | TA (°C) TA (°C) | Referensi Reference |
|----|--------------------------------|---|--------------------|---|
| 1 | mHbCIR124F mHbCIR124R | TCATTCAAGTTCACCGTGCTTATT AGCGCATGTATTGCCTTATGTCTC | 55 | Le Guen <i>et al</i> 2002 |
| 2 | gSSR268F gSSR268R | TGGCATGATCGTTAACGAAAAA CGGTTCCCTACCTCAGCTTG | 54 | An <i>et al.</i> 2013 |
| 3 | MA66F MA66R | AACAACGCCAACGCTACCTCCTT CGCTACACCACAACAACTCCACAG | 55 | Lespinasse I., 2000 |
| 4 | MT65F MT65R | CAGGCCAGTTCAAAGGATGTGC GGGCCAGAGTCAAAAGAGTAA | 51 | Lespinasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 |
| 5 | M574F M574R | TGTGTCCTCTACTTGTCTTCATTG ATAAAGGAGAAAGAAAAGTAGAGGC | 50 | Lespinasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 |
| 6 | P007F P007R | AGCAATCTCTCAGCCTCC ATGGCACCAACCACAAAC | 54 | Cubry <i>et al.</i> , 2015 |
| 7 | HESR029F HESR029R | GGAGTGGCCGATGATATGAG AAGTGGAAATACAATGGACA | 54 | An <i>et al.</i> 2013 |
| 8 | M127F M127R | GGACCAAAGGAATGTCAAAGC CGTGAGGTAAGGCCATTAAAC | 51 | Lespinasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 |
| 9 | MA31F MA31R | TCCTGCCATCCTTATCCT TTTTGTATTGCCCGAGCCGTGAGT | 54 | Lespinasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 |
| 10 | M421F M421R | TTTTCACTGTTGCTTGCTTCT GTGACTTTATCTGGATGGGTTAG | 50 | Lespinasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2000 |

bagian atas dipipet ke tabung baru dan ditambahkan dengan isopropanol dingin sebanyak satu volume.

Sampel dikocok secara perlahan sampai homogen dan selanjutnya disimpan pada suhu 4°C selama 30 menit, dan disentrifus 10 menit 11.000 rpm. Selanjutnya pellet DNA diambil dan dikeringkan. DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 1 mL buffer TE (10M Tris-HCl PH 8.0, 1 M EDTA), lalu ditambahkan CH₃COONa 3 M pH 5.2 sebanyak 1/1 V dan ethanol absolut sebanyak 2.5 ml, selanjutnya dikocok sampai homogen dan disimpan pada suhu -20°C selama 20 menit. Selanjutnya campuran disentrifus 10 menit 12.000 rpm pada suhu 4°C, dan pellet DNA yang diperoleh dicuci dengan ethanol 70% dan dikeringkan. Kemudian pellet dilarutkan dalam 100 L buffer TE dan disimpan pada suhu -20°C. Kualitas dan kuantitas DNA diuji menggunakan elektroforesis agarose 1% dan pengukuran menggunakan spektrofotometer.

Amplifikasi PCR dengan Primer SSR

Reaksi PCR dilakukan dalam volume 25 μ l yang terdiri dari 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP mix, 2 mM MgCl₂, 0.5 U Taq polymerase (Kapa Biosystem Inc. USA), 0.2 μ M each primers, dan 5 ng templat DNA. Volume akhir diatur menjadi 25 μ l dengan menambahkan *nuclease free water*. Amplifikasi dilakukan menggunakan DNA thermal cycler (T-Personal, Biometra, German) dengan menggunakan program denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti denaturasi pada 95 °C selama 15 detik, annealing 53-58 °C selama 30 detik, extention 72°C selama 10 detik sebanyak 35 siklus dan final extention pada 72°C selama 3 menit.

Visualisasi Hasil PCR

Analisis kualitas hasil PCR yang dihasilkan dilakukan dengan elektroforesis agarose 1%. Hasil PCR dengan kualitas baik selanjutnya di elektroforesis pada 3% agarose superfine atau 6% gel poliakrilamid

yang sudah didenaturasi dengan 7 M Urea. Selanjutnya elektroforesis gel dijalankan selama 1.5 jam dalam buffer SB 1x (Brody dan Kern 2004) pada 60 W secara konstan menggunakan alat elektroforesis vertikal (Cole-Parmer®).

Sebelum dimasukan ke dalam gel elektroforesis, hasil PCR dicampur dengan 1x volume loading buffer yang mengandung 10 mM EDTA, 98% formamide, 0.01% xylene cyanol, 0.01% bromophenol blue, kemudian didentaurasi pada 94 °C selama 3 menit. Ukuran fragmen DNA hasil PCR diperkirakan menggunakan marker.

Evaluasi Polimorfisme Marka SSR dan Analisis Keragaman Genetik Klon-Klon IRR seri 400

Pita-pita yang diperoleh pada plat kaca diskoring secara manual berdasarkan posisi alel dan disusun dalam Excel untuk analisis selanjutnya. Analisis pengelompokan genotipe berdasarkan *Dissimilarity Index Simple Matching* pada bootstraps 10000 dengan metode *Neighbour Joining Tree* dilakukan dengan menggunakan software DARwin6.0.021 dimana matriks ketidakseamaan (*dissimilarity*) tiap kombinasi pasangan individu dihitung berdasarkan *Dissimilarity Index Simple Matching* pada bootstraps 10000 berdasarkan persamaan:

$$Dij = 1 - 1/L \sum_{i=1}^L m1/\pi \dots \dots \dots \quad (1)$$

dimana dij adalah ketidaksamaan antara i dan j , L jumlah lokus, π merupakan tingkat ploidi dan m_1 merupakan jumlah alel yang umum diantara i dan j untuk lokus 1 (Perrier dan Jacquemoud-Collet, 2019).

Analisa Pola Sidik Jari DNA Setiap Klon

Pola sidik jari DNA masing-masing klon karet dianalisis secara manual dengan melakukan pengamatan secara visual pada pola alel yang dihasilkan pada setiap lokus di masing-masing klon karet. Skoring posisi alel ditampilkan dalam bentuk kode warna dimana abu-abu menunjukkan kemunculan alel dan warna putih untuk alel yang tidak muncul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengembangan teknologi sidik jari DNA tanaman karet merupakan suatu keharusan untuk menjaga mutu genetik suatu klon unggul yang dihasilkan oleh

Pusat Penelitian Karet. Kegiatan penelitian untuk pengembangan sidik jari spesifik klon telah dilakukan secara bertahap pada semua klon karet koleksi plasma nutfah Pusat Penelitian karet. Identifikasi sidik jari DNA klon IRR seri 400 disiapkan dalam rangka karakterisasi dan penyusunan database genetic calon klon-klon unggul baru yang akan dilepas dan direkomendasikan oleh Pusat Penelitian Karet.

Terdapat sepuluh klon IRR seri 400 yang saat ini sedang dilakukan pengujian adaptabilitas pada dua kondisi agroklimat berbeda, yaitu di kebun Percobaan PT. Sucofindo, Sumatera Utara yang mewakili iklim basah dan Kebun Percobaan Pusat Penelitian Karet, Sembawa, Sumatera Selatan mewakili iklim sedang. Klon-klon tersebut merupakan klon-klon terbaik yang dihasilkan pada seleksi Plot Promosi yang dilakukan pada kebun Percobaan Unit Sungai Putih, Pusat Penelitian Karet pada tahun 2004-2014. Klon-klon tersebut sedang dalam persiapan pengajuan Perlindungan Varietas Tanaman (PVT) dan ijin pelepasan klon anjuran baru.

Identifikasi Morfologi Klon IRR seri 400

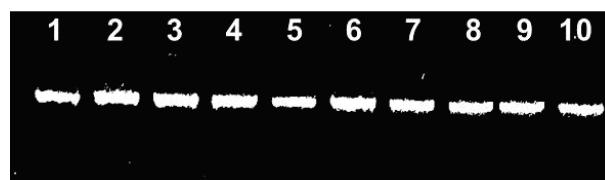
Setiap klon karet memiliki perbedaan morfologis dengan klon karet lainnya. Beberapa karakter yang digunakan sebagai pedoman karakterisasi morfologis klon karet adalah bentuk, ukuran dan jarak antar payung daun, bentuk, ukuran dan warna daun, bentuk pinggiran daun, jarak dan posisi helai daun, posisi tangkai dan anak tangkai daun, posisi mata entres serta warna batang tanaman. Berdasarkan karakter tersebut telah dilakukan karakterisasi morfologi 10 klon IRR seri 400 oleh tim Pemuliaan Pusat Penelitian Karet (dokumen internal Pusat Penelitian Karet).

Pengambilan pohon sampel sumber DNA masing-masing klon IRR seri 400 dilakukan secara acak setelah semua pohon sumber mata entres dipastikan dan dimurnikan secara morfologi. Pemurnian dilakukan berdasarkan karakter morfologi masing-masing klon IRR seri 400 seperti yang dijelaskan pada Panduan Pelaksanaan Uji Keunikan, Keseragaman dan Kestabilan Tanaman Karet oleh Pusat Perlindungan Varietas Tanaman dan perijinan Pertanian, Kementerian Pertanian Indonesia (PVT/PPU/62/1.22 Juli 2014).

Elektroforesis Amplifikasi PCR

G a m b a r 1 m e n u n j u k k a n elektroforesis DNA klon karet IRR seri 400 hasil ekstraksi yang akan digunakan untuk analisis PCR. DNA yang dihasilkan memiliki kuantitas dan kualitas yang cukup baik yang terlihat dari ketebalan, kejelasan, dan kebersihan fragmen DNA yang dihasilkan. Kualitas DNA merupakan faktor utama penentu keberhasilan proses amplifikasi DNA pada analisis menggunakan marka SSR. Hal ini disebabkan karena kandungan polifenol, protein, polisakarida dan pengotor lainnya dapat menghambat inisiasi penempelan primer pada DNA template sehingga proses amplifikasi PCR tidak dapat berjalan.

Analisis sidik jari DNA klon-klon karet dilakukan berdasarkan penggandaan fragment DNA yang diinisiasi oleh masing-masing primer SSR melalui proses PCR serta analisis ukuran fragment yang dihasilkan. Fragment DNA tersebut menunjukkan perbedaan pola alel masing-masing klon pada setiap lokus SSR yang dianalisis. Elektroforesis hasil amplifikasi PCR menggunakan marka SSR memerlukan gel dengan matrik yang rapat agar dapat memisahkan alel pada suatu marka seperti yang terdapat pada gel akrilamid (Diputra, 2013). Penggunaan gel akrilamid mampu memisahkan alel heterozigot yang memiliki perbedaan ukuran <50 bp, sedangkan gel agarose hanya mampu memisahkan



1.IRR 425 2. IRR 428 3. IRR 429 4. IRR 431 5.IRR 434
6.IRR 440 7.IRR 449 8. IRR 450 9. IRR 455 10.IRR 457

Gambar 1. Elektroforesis gel agarose 1% DNA 10 klon karet IRR seri 400
Figure 1. Electrophoresis of 1% agarose gel DNA of 10 IRR 400 series rubber clones

fragment DNA yang berukuran di atas 100 bp. Gambar 2 menunjukkan perbedaan kemampuan memisahkan alel pada gel agarose 1% dan akrilamid 6%. Penggunaan gel agarose 1% belum mampu menunjukkan perbedaan alel antar klon karet (Gambar 2A), namun sebaliknya dengan gel akrilamid 6% yang mampu menunjukkan perbedaan jumlah dan posisi alel serta penentuan heterozigositas dari masing-masing klon (Gambar 2B).

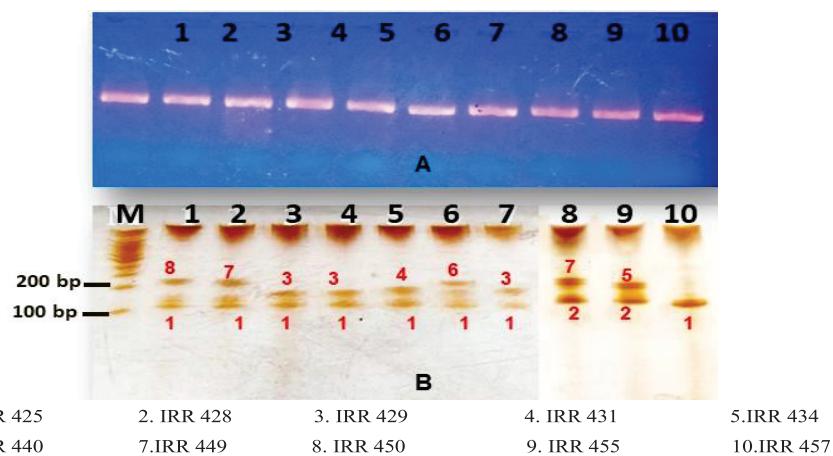
Evaluasi Polimorfisme Marka SSR dan Analisis Keragaman Genetik Klon-Klon Karet

Gambar 2B merupakan contoh profil elektroforesis hasil amplifikasi PCR lokus P007 pada 10 klon karet IRR seri 400 menggunakan gel akrilamid 6%. Setiap klon memiliki pola sidik jari DNA yang berbeda yang ditandai dengan jumlah dan posisi alel yang berbeda. Dari jumlah alel dapat ditentukan tipe lokus suatu klon apakah homozigot yang ditandai oleh jumlah alel yang hanya satu atau heterozigot yang

ditandai oleh jumlah alel sebanyak dua alel.

Elektroforesis hasil amplifikasi 10 lokus pada 10 klon karet menunjukkan bahwa setiap klon memiliki jumlah dan ukuran alel yang berbeda pada setiap lokus (Tabel 3). Hal ini menunjukkan adanya keragaman genetik klon karet pada masing-masing lokus yang dianalisis. Keragaman tertinggi ditemukan pada lokus Hesro29 dan M127 yang menghasilkan jumlah alel terbanyak, yaitu sebanyak 1-9 alel yang terdeteksi dengan ukuran 190-400 bp dan 220-410 bp, sedangkan jumlah alel minimum yang teridentifikasi adalah sebanyak 1 alel dengan ukuran 200 bp yang ditemukan pada lokus M574. Total alel yang berhasil diidentifikasi menggunakan 10 lokus SSR adalah sebanyak 53 alel dengan rata-rata 5,3 alel per lokus.

Berdasarkan analisis UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic*) menggunakan metode *Matrix Dissimilarity Simple Matching* 10 klon IRR seri 400 diketahui bahwa berdasarkan jumlah dan ukuran alel masing-masing



Gambar 2. Perbedaan pola pemisahan pita DNA hasil amplifikasi PCR pada 10 klon karet IRR seri 400 menggunakan primer P007 pada elektroforesis gel agarose 1% (A) dan gel akrilamid 6% (B). M=Ladder 100 bp. 1-8= nomor posisi alel.

Figure 2. The differences of DNA fragment separation pattern obtained by PCR amplification on 10 IRR 400 series of rubber clones by using P007 primer on electrophoresis of 1% agarose gel (A) and 6% acrylamide gel (B). M=100 bp Ladder. 1-8= number of alleles position

lokus 10 klon IRR seri 400 terpisah menjadi dua kelompok besar dengan perbedaan sebesar 32% dan setiap kelompok besar terbagi menjadi beberapa kelompok kecil (Gambar 3). Pengelompokan terbentuk berdasarkan perbedaan alel yang dimiliki. Terbentuknya kelompok-kelompok kecil menunjukkan keragaman genetik yang dimiliki oleh 10 klon IRR seri 400 yang dianalisis. Apabila dibandingkan dengan

analisis keragaman genetik klon-klon karet koleksi plasma nutfah Pusat Penelitian Karet (Oktavia *et al.*, 2017) terlihat bahwa keragaman genetik 10 klon IRR seri 400 terlihat lebih rendah. Hal ini diduga disebabkan karena klon IRR seri 400 merupakan hasil persilangan dari klon-klon koleksi plasma nutfah tersebut sehingga terjadi penyempitan keragaman genetik akibat persilangan.

Tabel 3. Jumlah dan ukuran alel yang dihasilkan amplifikasi 10 lokus SSR pada 10 klon karet IRR seri 400

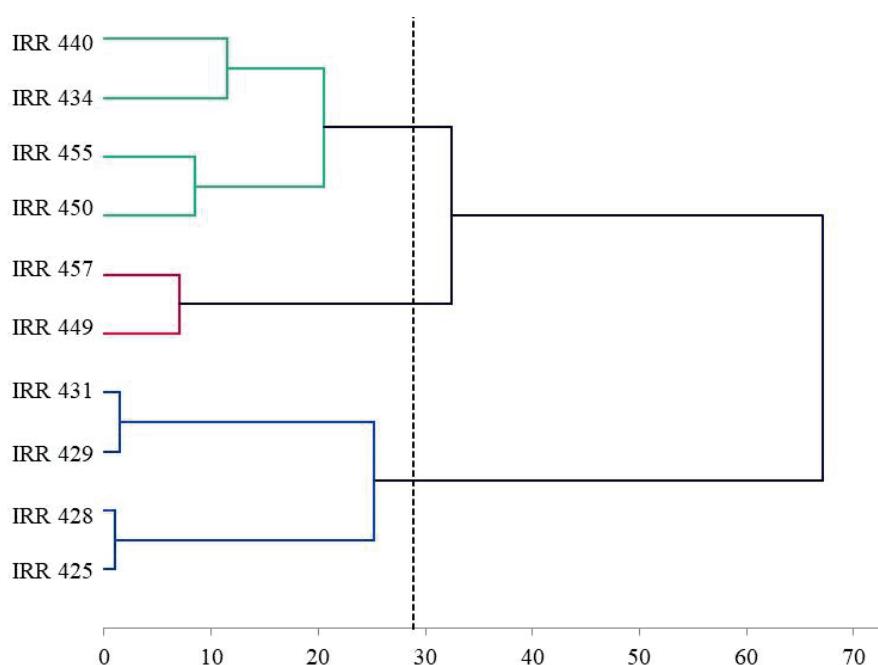
Table 3. number and size of allele obtained from amplification of 10 SSR locus on 10 of IRR 400 series rubber clones

| No | Lokus | Jumlah Alel | Ukuran Alel (bp) |
|----|-----------|-------------------|------------------|
| No | Locus | Number of alleles | Allele size (bp) |
| 1 | mHbCIR124 | 7 | 150-300 |
| 2 | gSSR268 | 7 | 200-400 |
| 3 | MA66 | 2 | 250-400 |
| 4 | MT65 | 2 | 250-500 |
| 5 | M574 | 1 | 200 |
| 6 | P007 | 8 | 110-220 |
| 7 | Hesro29 | 9 | 190-400 |
| 8 | M127 | 9 | 220-410 |
| 9 | MA31 | 2 | 170-250 |
| 10 | M421 | 8 | 110-200 |

Pengelompokan klon belum menunjukkan kedekatan secara silsilah tetua seperti yang tercantum pada Tabel 1, dimana klon-klon yang memiliki salah satu atau kedua klon tetua yang sama berada pada kelompok kecil yang sama, kecuali pada klon IRR 429 dan IRR 431 yang berada pada kelompok kecil yang sama (Gambar 3). Hal ini diduga karena keterbatasan jumlah primer yang digunakan sehingga belum mampu mendeteksi perbedaan alel pada lokus antar klon. Keragaman alel yang tinggi ini sangat diperlukan dalam analisis sidik jari DNA, sehingga diharapkan peluang memperoleh penanda SSR spesifik klon

lebih besar. Selain untuk pengembangan sidik jari DNA, Informasi keragaman genetik menempati posisi penting dalam optimalisasi pemanfaatan plasma nutraf sebagai dasar dalam pemilihan tetua persilangan.

Pemilihan dan penggunaan klon tetua yang memiliki keragaman genetik luas berpeluang akan menghasilkan turunan F1 yang lebih baik dari tetua, sedangkan penggunaan klon tetua yang berkerabat dekat dapat mengakibatkan terjadinya *inbreeding* (silang dalam) bahkan kepatuhan genetik.



Gambar 3. Dendrogram 10 klon karet IRR seri 400 berdasarkan 10 lokus SSR menggunakan metode Neighbour-Joining berdasarkan *matrix Dissimilarity Simple Matching*

Figure 3. Dendrogram of 10 IRR 400 series rubber clones based on 10 of SSR locus by using Neighbour-Joining method based on matrix Dissimilarity Simple Matching

Analisa Pola Sidik Jari DNA Setiap Klon

Gambar 4 menunjukkan hasil amplifikasi PCR dan elektroforesis akrilamid 6% klon IRR seri 400 menggunakan 10 primer SSR. Dari 10 primer yang digunakan, 7 primer bersifat polimorfik serta menghasilkan pemisahan alel yang baik dan jelas sehingga terlihat perbedaan genetik antar klon, sedangkan 3 primer yaitu MA 66, MT 65, dan M574 bersifat monomorfik dimana semua posisi alel sama pada semua klon yang dianalisis. Polimorfisme yang

tinggi sangat dibutuhkan untuk meningkatkan peluang diperolehnya sidik jari DNA spesifik klon. Semakin banyak jumlah primer polimorfik yang digunakan, maka akan semakin besar peluang sidik jari spesifik klon yang akan dihasilkan.

Gambar 5 menunjukkan jumlah dan posisi alel pada setiap lokus yang di susun berdasarkan pengamatan visual hasil amplifikasi PCR. Amplifikasi klon IRR seri 400 menggunakan primer MHbCIR 124 mampu menghasilkan total 7 alel yang

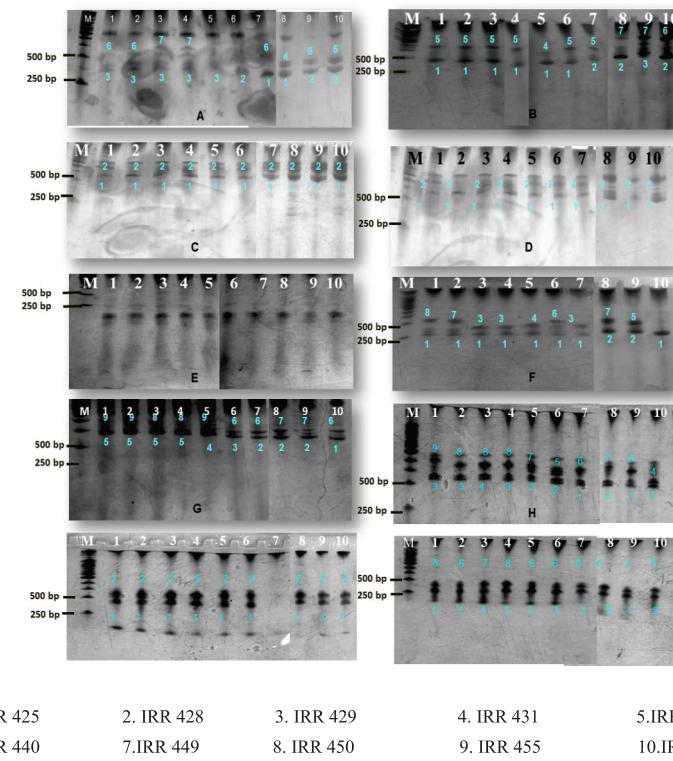
berukuran 150-300 bp dengan posisi berbeda pada kesepuluh klon yang dianalisis. Sebagian besar klon bersifat heterozigot yang ditandai dengan adanya dua alel di masing-masing klon, kecuali IRR 434 dan IRR 440 bersifat homozigot yang ditandai dengan ditemukannya hanya satu alel (Gambar 4A dan 5). Terdapat alel spesifik yang hanya ditemukan pada klon tertentu pada lokus mHbCIR124, yaitu alel homozigot pada klon IRR 434 (3,3) dan IRR 440 (2,2) serta alel heterozigot pada klon IRR 449 (1,6) dan IRR 450 (1,4). Selain itu terdapat alel yang ditemukan pada lebih dari satu klon yaitu alel 3,6 yang ditemukan pada klon IRR 425 dan IRR 428, alel 3,7 yang ditemukan pada klon IRR 429 dan IRR 431 serta alel 2,5 pada klon IRR 425 dan IRR 457.

Posisi alel yang spesifik pada suatu lokus yang hanya ditemukan pada suatu klon dapat digunakan sebagai penanda sidik jari DNA klon tersebut, sedangkan alel yang terdapat pada beberapa klon pada suatu lokus dapat dijadikan penanda untuk klon

yang bersangkutan dengan menggabungkan dengan penanda spesifik dari lokus lain.

Perbedaan posisi alel tersebut selanjutnya dijadikan sebagai dasar untuk melihat marka SSR yang menunjukkan profil sidik jari masing-masing klon IRR seri 400. Berdasarkan hasil skoring pada gambar 4 dilakukan seleksi marka SSR spesifik klon tertentu (Tabel 4). Marka SSR ditentukan berdasarkan lokus dan nomor posisi alel yang dimilikinya. Pengelompokan marka SSR dibedakan atas spesifik klon yang berarti marka tersebut hanya ditemukan pada satu klon tertentu, satu marka yang sama ditemukan pada dua klon dan marka yang ditemukan pada banyak klon lebih dari dua yang disebut juga dengan marka konstitutif.

Marka yang berpeluang besar untuk dijadikan sebagai sidik jari DNA suatu klon adalah marka-marka yang spesifik hanya ditemukan pada satu klon tersebut. Semakin banyak marka spesifik, maka akan semakin mudah untuk mengidentifikasi



Gambar 4. Hasil amplifikasi PCR klon karet IRR seri 400 menggunakan elektroforesis gel akrilamid 6% pada primer mHbCIR124 (A), gSSR268(B), MA66 (C), MT65 (D), M574 (E), P007 (F), Hesro29 (G), M127 (H), MA31(I) dan M421 (J)

Figure 4. PCR amplification product of IRR 400 series rubber clone by using 6% acrylamide gel electrophoresis on mHbCIR124 (A), gSSR268(B), MA66 (C), MT65 (D), M574 (E), P007 (F), Hesro29 (G), M127 (H), MA31(I) and M421 (J) primers

klon tersebut. Terdapat marka spesifik yang ditemukan pada masing-masing klon IRR seri 400 (Tabel 4). Sidik jari DNA klon IRR 425 berhasil diidentifikasi pada lokus P007 dengan posisi alel nomor 1 dan 8 (P007_1,8) dan lokus M127 posisi alel nomor 3 dan 9 (M127_3,9), sedangkan pada klon IRR 428 hanya berhasil diidentifikasi 1 marka P007_1,7 yang spesifik hanya ditemukan pada klon tersebut. Marka M127_4,8 dan M421_1,7 merupakan marka spesifik klon IRR 429 dan M421_2,8 spesifik klon IRR 431. Marka-marka spesifik tersebut hanya ditemukan pada klon tersebut dan dapat digunakan sebagai penanda DNA untuk mengidentifikasi klon terkait. Berdasarkan Tabel 4 juga terlihat bahwa pada klon IRR 425, IRR 428, IRR 429 dan IRR 431 hanya berhasil diidentifikasi 1 - 2 marka yang spesifik terhadap masing-masing klon sehingga kedepannya perlu dilakukan eksplorasi primer SSR lebih lanjut untuk mengidentifikasi marka-marka spesifik masing-masing klon tersebut.

Sidik jari DNA klon IRR 434, IRR 440, IRR 449, IRR 450, IRR 455 dan IRR 457 berhasil diidentifikasi menggunakan 3-5 marka spesifik masing-masing klon. Menurut Clement-Demange, 2018 (komunikasi pribadi) semakin banyak marka spesifik klon yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu klon maka akan semakin tinggi keakuratannya. Terdapat 5 marka spesifik klon IRR 434 yaitu P007_1,4, mHbCIRM124_3,3, gSSR268_1,4, HESRO29_4,9 dan M127_3,7, enam marka spesifik IRR 440 yaitu P007_1,6, mHbCIRM124_2,2, gSSR268_1,5, HESRO29_3,6, M127_2,5 dan M421_1,6, lima marka spesifik IRR 449 yaitu mHbCIRM124_1,6, gSSR268_2,5, HESRO29_2,6, M127_1,6 dan M421_3,6, empat marka spesifik IRR 450 yaitu P007_2,7, mHbCIRM124_1,4, gSSR268_2,7 dan M127_1,7, tiga marka spesifik klon IRR 455 yaitu P007_2,5, gSSR268_3,7 dan M421_1,4, serta empat marka spesifik klon IRR 457 yaitu P007_1,1, gSSR268_2,6,



Gambar 5. Profil skoring posisi alel setiap lokus pada 23 klon karet. Warna abu-abu menunjukkan amplifikasi positif pada masing-masing posisi alel yang ditandai dengan nomor 1-9

Figure 5. Scoring profile of allele position of each locus on 23 rubber clones. Grey colour indicate of positive amplification on each allele position that indicated by number of 1-9

Sidik jari DNA klon IRR 434, IRR 440, IRR 449, IRR 450, IRR 455 dan IRR 457 berhasil diidentifikasi menggunakan 3-5 marka spesifik masing-masing klon. Menurut Clement-Demange, 2018 (komunikasi pribadi) semakin banyak marka spesifik klon yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu klon maka akan semakin tinggi keakuratannya. Terdapat 5 marka spesifik klon IRR 434 yaitu P007_1,4, mHbCIRM124_3,3, gSSR268_1,4, HESRO29_4,9 dan M127_3,7, enam marka spesifik IRR 440 yaitu P007_1,6, mHbCIRM124_2,2, gSSR268_1,5, HESRO29_3,6, M127_2,5 dan M421_1,6, lima marka spesifik IRR 449 yaitu mHbCIRM124_1,6, gSSR268_2,5, HESRO29_2,6, M127_1,6 dan M421_3,6,

empat marka spesifik IRR 450 yaitu P007_2,7, mHbCIRM124_1,4, gSSR268_2,7 dan M127_1,7, tiga marka spesifik klon IRR 455 yaitu P007_2,5, gSSR268_3,7 dan M421_1,4, serta empat marka spesifik klon IRR 457 yaitu P007_1,1, gSSR268_2,6, HESRO29_1,6 dan M421_2,5.

Selain marka spesifik klon, juga berhasil diidentifikasi marka yang terdapat pada 2 klon seperti marka mHbCIRM124_3,6 yang ditemukan pada klon IRR 425 dan IRR 428. Marka-marka tersebut dapat dijadikan sebagai alternatif marka tambahan dalam identifikasi klon berdasarkan sidik jari DNA, namun masih memerlukan marka tambahan yang bisa membedakan kedua klon yang memiliki marka tersebut.

Tabel 4. Daftar marka SSR spesifik klon IRR seri 400

Table 4. List of specific SSR marka on IRR 400 series clone

| No | Klon | | Marka SSR Spesifik | | | |
|----|---------|--------------------|------------------------|----------------|----------------|-------------------------------------|
| | | | Specific of SSR Marker | | | |
| | | Spesifik Klon | 2 klon sama | | | |
| | | Specific of clones | 2 of same clone | | | |
| 1 | IRR 425 | P007_1,8 | M127_3,9 | mHbCIRM124_3,6 | HESRO29_5,9 | |
| 2 | IRR 428 | P007_1,7 | | mHbCIRM124_3,6 | HESRO29_5,9 | M127_3,8 |
| 3 | IRR 429 | | M127_4,8 | M421_1,7 | mHbCIRM124_3,7 | HESRO29_5,8 |
| 4 | IRR 431 | | | M421_2,8 | mHbCIRM124_3,7 | HESRO29_5,8 |
| 5 | IRR 434 | P007_1,4 | mHbCIRM124_3,3 | gSSR268_1,4 | HESRO29_4,9 | M127_3,7 |
| 6 | IRR 440 | P007_1,6 | mHbCIRM124_2,2 | gSSR268_1,5 | HESRO29_3,6 | M127_2,5 M421_1,6 |
| 7 | IRR 449 | | mHbCIRM124_1,6 | gSSR268_2,5 | HESRO29_2,6 | M127_1,6 M421_3,6 |
| 8 | IRR 450 | P007_2,7 | mHbCIRM124_1,4 | gSSR268_2,7 | M127_1,7 | HESRO29_2,7 M421_2,6 |
| 9 | IRR 455 | P007_2,5 | | gSSR268_3,7 | M421_1,4 | mHbCIRM124_2,5 HESRO29_2,7 M127_1,6 |
| 10 | IRR 457 | P007_1,1 | | gSSR268_2,6 | HESRO29_1,6 | M421_2,5 mHbCIRM124_2,5 M127_1,4 |

catatan: Marka SSR spesifik ditunjukan dengan nama lokus diikuti nomor alel
Note: Specific SSR markers indicated by name of locus followed by allele number

Marka SSR yang diperoleh pada penelitian ini lebih akurat dibandingkan dengan pengembangan marka RAPD sebagai sidik jari DNA klon karet anjuran yang sudah dilaporkan sebelumnya (Oktavia *et al.*, 2009). Hal ini karena SSR merupakan marka kodominan (dapat membedakan homozigot dan heterozigot) yang dikembangkan langsung dari genom tanaman karet sehingga sudah bersifat spesifik tanaman karet serta memiliki tingkat keterulangan yang tinggi (*repeatable*), sedangkan RAPD masih merupakan metode amplifikasi PCR yang bersifat umum, random, dominan (tidak dapat membedakan homozigot dengan heterozigot) serta tingkat

keterulangan yang rendah (*nonrepeatable*). Berdasarkan Tabel 4 diketahui bahwa 10 primer yang digunakan mampu mengidentifikasi sidik jari DNA 10 klon karet IRR seri 400 yang dianalisis. Delapan dari 10 primer tersebut merupakan primer SSR yang telah digunakan oleh Cirad, Perancis dalam mengidentifikasi jenis-jenis klon karet di dunia berdasarkan sidik jari DNA (Le-Guen *et al.*, 2012). Untuk meningkatkan keakuratan data, primer-primer tersebut dapat dikombinasikan dengan primer-primer SSR lainnya yang sudah dilaporkan memiliki pola spesifik klon karet (Budiani *et al.*, 2014) sehingga dapat meningkatkan peluang mendapatkan marka yang lebih akurat.

Apabila diperhatikan jumlah alel yang dihasilkan pada Gambar 4, kedepannya lokus-lokus tersebut berpeluang digunakan untuk pengembangan sidik jari klon-klon karet koleksi plasma nutfah lainnya untuk pengembangan *database sidik jari DNA plasma nutfah karet*.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Jumlah alel yang dihasilkan 10 lokus SSR pada 10 klon IRR seri 400 adalah 53 alel dengan rata-rata 5,3 alel per lokus.
2. Terdapat 33 alel spesifik dengan jumlah marka 2-6 marka per klon berhasil diidentifikasi dari 10 lokus SSR yang digunakan. Alel spesifik klon tersebut dapat digunakan sebagai set marka penciri (sidik jari DNA) untuk mengidentifikasi 10 klon IRR seri 400 serta pengembangan *database* yang berguna untuk pengelolaan dan perlindungan plasma nutfah karet Indonesia dari pencurian dan klaim pihak asing.
3. Untuk meningkatkan keakuratan, maka perlu dilakukan pengembangan lanjutan dengan penambahan marka SSR baru serta penambahan analisis klon-klon karet lain koleksi plasma nutfah.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V & Singh L. 2007. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor Appl Genet* 114, 359-72.
- Blair MW, Panaud O & McCouch SR. 1999. Intersimple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and finger-printing in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780-792.
- Brantestam AK, Bothmer RV, Dayteg C, Rashal I, Tuvesson S & Weibull J. 2007. Genetic diversity changes and relationships in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm of Nordic and Baltic areas as shown by SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 749-58.
- Bredemeijer M, Cooke J, Ganal W, Peeters R, Isaac P, Noordijk Y, Rendell S, Jackson J, Roder S, Wendehake K, Dijck M, Amelaine M, Wickaert V, Bertrand L & Vosman B. 2002. Construction and testing of a microsatellite containing more than 500 tomato varieties. *Theor. Appl. Genet.* 105:1019-1026.
- Budiani A, Woelan S, Minarsih H, Nurhaimi-Haris & Putranto RA. 2014. Evaluasi 18 primer *Simple Sequence Repeats* untuk pengembangan sidik jari DNA tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Menara Perkebunan*. 82(2): 81-93.
- Feng S, Wu Y, Li W, Yu F and Wang J. 2012. Analysis of Genetic Diversity and SSR Allelic Variation in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) in: The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity. ISBN: 978-953-51-0157-4
- Gouvêa LRL, Rubiano, LB, Chioratto, AF, Fernando, A, Zucchi MI & Paulo DSG. 2010. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genet and Mol Biol* 33, 308-18.
- Greenhill R, Serkova V, Mollison EMB. 2018. new DNA-based tool for clonal confirmation of *Hevea brasiliensis* planting materials. International Rubber Conference 2018. Abijan. Pantai Gading.
- Hasan M, Seyis F, Badani AG, Pons-Kuhnemann J, Friedt W, Luhs W & Snowdon RJ. 2006. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genet Res and Crop Evolution*, 53 (4), 793- 802.
- International Rubber Research Development Board. 2019. IRRDB Plant Breeding Workshop. 8-12 Juli 2019. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Liu Z. & Furnier GR. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 97 – 105.

- Livingstone DS, Motamayor JC, Schnell RJ, Cariaga K, Freeman B, Meerow AW & Kuhn DN. 2011. Development of single nucleotide polymorphism markers in *Theobroma cacao* and comparison to simple sequence repeat markers for genotyping of Cameroon clones. *Molecular Breeding*, 27(1), 93–106. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9416-2>
- Oktavia F, Lasminingsih M & Kuswanhadi. 2009. Identifikasi klon karet anjuran dengan teknik RAPD. *J Penelitian Karet* 27(1): 21-31.
- Oktavia F, Kuswanhadi, Dinarty D, Widodo & Sudarsono. 2017. Genetic diversity and population structure of IRRDB 1981 and Wickham Rubber Germplasm based on EST-SSR. *Agribita J Agri Sci.* 29(3):239-251.
- Pootakham W, Chanprasert J, Jomchai N, Sangsakru D, Yoocha T, Tragoonrueng S & Tangphatsornruang S.. 2012. Development of genomic-derived simple sequence repeat markers in *Hevea brasiliensis* from 454 genome shotgun sequences. *Plant Breed* 131, 555–562.
- Saha T, Roy CB & Nazeer MA. 2005. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breed* 124 (1), 86-92.
- Suparningtyas JF, Pramudyawardhani O, Purwoko D & Tajuddin T. 2018. Analisis filogenetik beberapa klon karet dengan marka AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 5 (1): 8-19.
- Takrama J, Dadzie AM, Opoku SY, Padi FK, Adomako B, Adu-Ampomah Y, Livingstone S, Motamayor JC, Schnell RJ & Kuhn DN. 2012. Applying SNP marker technology in the cacao breeding programme in Ghana. *African Crop Science Journal*, 20(1):67-75.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Horne M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M & Zabeau M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21) : 4407 – 4414.
- William JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA & Tingey SV. 1990. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yu F, Wang, BH Feng, ,SP, Wang JY, Li WG & Wu YT . 2011. Development, characterization, and cross-species/genera transferability of SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Rep.* 30(3), 335–344.

