# Analisis Kesesuaian Marka SSR (*Simple Sequence Repeats*) untuk Identifikasi Keragaman Genetik pada Kacang Bambara Asal Jawa Barat

### Safarinda Nurdianawati<sup>1</sup>, Noladhi Wicaksana<sup>2</sup>, dan Anas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa PascasarjanaProgram Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran <sup>2</sup>Staf Pengajar Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Jln. Raya Bandung – Sumedang Km 21 Jatinangor

#### ABSTRACT

# Suitability Analysis of SSR Marker (Simple Sequence Repeats) for Genetic Diversity Identification in Bambara Groundnut West Java Origin

Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) is one of legume crops that has not been widely cultivated. It becomes food alternative sources in Indonesia as it has high of protein and carbohydrate content and low fat. Furthermore, bambara groundnut should be good production in marginal land. Molecular marker has been used for any crop development such as genetic diversity, matting system, clones identification, etc. This research used neutral genetic markers (SSR) to study genetic diversity in Bambara groundut population from West Java. Fifteen primers has used and the results showed that primer 1 and primer 19 were polymorphic and informative because the locus has high H<sub>E</sub> (heterozygosity) and PIC (Polymorphic Information Content) value compare to others. The higher H<sub>E</sub> and PIC value the more informative to distinguish each individual between genotype in one population.

Keywords: Bambara groundnut (*Vigna subterranea*), Genetic diversity, Simple sequence repeats (SSR)

### **ABSTRAK**

Kacang bambara (*Vigna subterranea*) merupakan salah satu tanaman *legume*yang belum terlalu banyak dibudidayakan dan dapat menjadi sumber pangan alternative di Indonesia karena kandungan protein dan karbohidratnya cukup tinggi dan rendah lemak. Selain itu, tanaman ini juga dilaporkan dapat berproduksi dengan baik pada lahan-lahan marginal. Penggunaan marka molekuler telah banyak digunakan pada tanaman untuk berbagai tujuan antara lain untuk mengevaluasi keragaman genetik suatu populasi, menduga system perkawinan, identifikasi klon dan lain-lain. Dalam penelitian ini digunakan marka netral (SSR) untuk mempelajari keragaman genetik populasi Kacang bambara (*Vigna subterranea*) asal Jawa Barat. Dari lima belas primer, primer 1 dan primer 19 merupakan primer yang bersifat polimorfik dan informative karena lokus tersebut memiliki nilai H<sub>E</sub> (heterozigositas) dan PIC (*Polymorphic Information Content*) yang tinggi dibandingkan dengan primer-primer lainnya. Semakin tinggi nilai H<sub>E</sub> dan PIC yang dihasilkan maka primer tersebut semakin informatif dalam membedakan individu antar genotip dalam populasi.

Kata Kunci : Kacang bambara (Vigna subterranea), Keragaman genetik, Simple Sequence Repeats (SSR)

### **PENDAHULUAN**

Indonesia merupakan salah satu negara kaya akan sumberdaya hayati untuk memenuhi kebutuhan manusia. Banyak sumberdaya hayati di Indonesia yang masih terabaikan dan belum dimanfaatkan dengan maksimal. Salah satunya adalah kacang-kacangan, yang dapat dimanfaatkan sebagai pangan serta kaya akan protein. Kacang bambara (*Vigna subterranea*) atau lebih dikenal sebagai kacang Bogor adalah salah satu tanaman kacang-kacangan yang dapat tumbuh baik di Indonesia, namun belum belum tersebar luas.

Kacang bambara merupakan tanaman yang berpotensi sebagai sumber pangan alternatif penghasil protein dan karbohidrat. Pada biji kering tanaman ini memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 16-21%, karbohidrat 50-60% dan lemak yang rendah 4,5-6,5%, serta mengandung kalsium, fosfor, zat besi, dan vitamin B1 (Purseglove, 1968; Suwanprasert *et al.*, 2006). Polong muda kacang bambara biasanya dikonsumsi dengan cara direbus, sedangkan biji kering biasanya diproses dahulu menjadi tepung dan sebagai bahan utama pembuatan susu di Harare (Hampson *et al.* 2000).

Selain kandungan nutrisi yang sangat baik, tanaman ini juga dilaporkan dapat berproduksi baik pada lahan-lahan marginal. Madamba (1995) melaporkan bahwa produktifitas kacang bambara pada kondisi lingkungan tumbuh yang marjinal di Zimbabwe dapat menghasilkan 300 kg/ha biji kering, namun pada kondisi lingkungan tumbuh optimal akan menghasilkan 4 ton/ha biji kering.

Penelitian kacang bambara di Indonesia belum banyak dilakukan, karena namanya kurang dikenal sehingga kacang bambara dinilai kurang komersial. Hal ini menyebabkan belum tersedianya varietas unggul kacang bambara. Varietas unggul yang dimaksud antara lain mempunyai hasil tinggi, toleran terhadap hama penyakit, umur genjah, nutrisi tinggi dll. Program pengembangan atau perakitan varietas unggul kacang bambara perlu Program segera dilakukan. pengembangan pemuliaan kacang bambara dapat diawali dengan upaya penyediaan informasi tentang keragaman dan struktur genetik plasma nutfah kacang bambara.

Keragaman genetik berperan penting dalam tanaman karena informasi pemuliaan dan pemahaman tentang keragaman genetik dapat keberhasilan program membantu tanaman (Lima et al., 2001). Keragaman genetik plasma nutfah merupakan salah satu komponen dasar dalam sistem pemuliaan tanaman,dimana keragaman genetik merupakan sumber informasi genetik dari sifat-sifat penting suatu tanman untuk perbaikan varietas. Agar keragaman plasma nutfah dapat dimanfaatkan dalam program perbaikan varietas, maka potensi sifat-sifat yang dimiliki harus diketahui.

Estimasi keragaman genetik dengan menggunakan marka morfologi banyak digunakan

karena praktis, cepat, dan mudah, pengamatan dilakukan dengan cara visual dan bersifat kuantitatif. Namun, marka morfologi kurang akurat untuk menganalisis keragaman dan struktur genetik tanaman karena dipengaruhi oleh lingkungan (Hussain *et al.*, 2008; Oumouloud *et al.*, 2009).

Marka molekular adalah pelengkap yang bermanfaat bagi karakter morfologi dan fenologi karena tidak dipengaruhi oleh lingkungan (Solmaz et al., 2010). Setiyo (2001) dan Asins et al., (1995) menjelaskan bahwa marka molekuler merupakan teknik yang efektif dalam analisis genetik dan telah diaplikasikan secara luas dalam program pemuliaan tanaman.

Marka mikrosatelit atau Simpel sequence repeats (SSR) banyak digunakan dalam pembelajaran taksonomi dan keragaman (Jatoi et al., 2006) karena marker ini dapat mengidentifikasi alel dengan reabilitas tinggi dan reproduktifitas (Guiterrez et al., 2005) dan telah terbukti sebagai salah satu marker yang paling tepat untuk keragaman genetik (Lee et al., 2007). Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh informasi keragaman genetik tanaman kacang bogor asal Jawa Barat berdasarkan marka SSR.

## **BAHAN DAN METODE**

akan Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran dan Laboratorium Genetika Fakultas Kedokteran Universitas Molekuler Padjadjaran. Penelitian ini akan dilakukan mulai dari September 2014 sampai dengan Januari 2015. Bahan-bahan yang digunakan pada percobaan ini adalah 70 aksesi kacang bambara asal Jawa Barat dan 15 pasang primer SSR.

Isolasi DNA yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). CTAB merupakan senyawa yang dapat mendegradasi dinding sel, denaturasi protein, memisahkan karbohidrat, merusak membran sel dan melarutkan DNA.

Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Proses PCR dilakukan dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada 94°C selama 3 menit; selanjutnya diulang sebanyak 35 siklus dengan kondisi 94°C selama 15 detik; 45-60°C (sesuai Tm primer) selama 1 menit; 72°C selama 1 menit; diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforensis

pada agarose 2% dengan tegangan 80 volt selama 70 menit.

Analisis data dilakukan berdasarkan hasil scoring pola pita DNA yang muncul pada plate. Hasil scoring dalam bentuk data biner, jika ada pita diberi skor satu dan jika tidak adapita diberi skor 0. Jumlah alel (Na), heterozigositas yang diharapkan (HO), keragaman genetik (heterozigositas yang diamati = HE) dihitung dengan menggunakan software POPGENE sedangkan polymorphic information content (PIC) dihitung formula:

 $PICi = 1 - \Sigma_j Pij^2$ 

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil POPGENE 32 menunjukkan bahwa jumlah alel (Na) yang dihasilkan dari lima belas primer SSR yang digunakan adalah 1 sampai 3 dengan rata-rata 2 alel per lokus. Jumlah alel yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan penelitiaan Siie dan Massawe (2012) yang menghasilkan 1 sampai 2 alel dengan rata-rata 1,1 alel per lokus, namun hasil tersebut lebih rendah dari penelitian Somta *et al.* (2011) yang mampu menghasilkan 4 sampai 10 alel dengan rata-rata 7,75 alel per lokus.

Teknologi PCR berdasarkan 15 primer marka SSR yang telah digunakan pada penelitian ini bersifat polimorfik sedang untuk membedakan semua aksesi kacang bambara asal Jawa Barat yang telah diteliti. Nilai rata-rata polymorphic information content (PIC) berdasarkan marka SSR ini adalah sebesar 0,33. Nilai PIC terkecil adalah primer 7 dengan nilai -0,17. sedangkan primer 1 dan primer 19 merupakan primer yang bersifat polimorfik dan informative dikarenakan memiliki nilai PIC yang tinggi. Nilai polymorphic information content (PIC) dijadikan standar untuk mengevaluasi marka genetik berdasarkan pita DNA hasil amplifikasi PCR, oleh karena itu nilai PIC dibagi menjadi tiga kelas yaitu PIC > 0,5 = sangat informatif, kemudian 0.25 > PIC > 0,5 = sedang, dan PIC < 0,25 = rendah (Botstein et al., 1980 dalam Mulsanti et al., 2013).

Keragaman genetik dapat pula ditunjukan heterosigositas actual (Ho) dari heterosigositas harapan (HE). Pada Tabel menunjukan bahwa primer 1 dan primer 19 bersifat informative karena lokus ini memiliki nilai HE dan PIC tertinggi jika dibandingkan dengan lokus-lokus lainnya. Semakin tinggi nilai HE dan PIC yang dihasilkan maka primer tersebut semakin informatif dalam membedakan individu antar genotip dalam populasi. Boer (2007) menyatakan bahwa nilai HE yang tinggi dapat mengindikasi keragaman yang tingi pada lokus tersebut. Selanjutnya, Sajib et al. (2012) menyatakan bahwa nilai PIC adalah ukuran polimorfisme suatu lokus antar genotip dengan menggunakan informasi jumlah alel.

Tabel 1. Parameter Informasi Keragaman berdasarkan marka SSR.

No	PRIMER	<b>N</b> A	<b>N</b> E	I	PIC	Но	HE	<b>F</b> ST	P-VALUE
1.	Primer 1	3	2.79	1.06	0.64	0.35	0.65	0.34	0
2.	Primer 7	2	1.50	0.51	-0.17	0.67	0.33	0.03	0.89
3.	Primer 10	3	1.16	0.30	0.13	0.86	0.14	0.08	0.29
4.	Primer 15	3	1.56	0.67	-0.06	0.64	0.36	0.07	0.24
5.	Primer 16	2	1.45	0.49	0.44	0.69	0.31	0.13	0.05
6.	Primer 19	3	2.10	0.81	0.63	0.47	0.53	0.33	0
7.	Primer 30	2	1.77	0.63	-0.08	0.56	0.44	0.05	0.63
8.	Primer 31	1	1.00	0.00	0.29	1.00	0.00	0.00	1
9.	Primer 32	3	2.08	0.88	0.53	0.48	0.52	0.18	0
10.	Primer 33	1	1.00	0.00	0.51	1.00	0.00	0.00	1
11.	Primer 41	1	1.00	0.00	0.36	1.00	0.00	0.00	1
12.	Primer D11	2	1.34	0.42	0.54	0.75	0.25	0.39	0
13.	Primer D14	1	1.00	0.00	0.47	1.00	0.00	0.00	1
14.	Primer D15	1	1.00	0.00	0.22	1.00	0.00	0.00	1
15.	PRIMER mBam2o80	2	1.20	0.30	0.46	0.83	0.17	0.08	0.24
Rata-rata		2	1.46	0.40	0.33	0.75	0.25	0.11	0.49

#### KESIMPULAN

Dari lima belas primer, primer 1 dan primer 19 merupakan primer yang bersifat polimorfik dan informatif karena lokus tersebut memiliki nilai HE dan PIC yang tinggi dibandingkan dengan primerprimer lainnya. Semakin tinggi nilai HE dan PIC yang dihasilkan maka primer tersebut semakin informative dalam membedakan individu antar genotip dalam populasi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Asins, MJ, Herrero, and Navarro. 1995. Factors affecting Citrus tree isozyme gene expression. Theor. Appl. Genet. 90: 892-898.
- Boer D. 2007. Keragaman dan Struktur Genetik Populasi Jati Sulawesi Tenggara Berdasarkan Marka Mikrosatelite. [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor
- Gutierrez MV, MC Vaz Patto, T Huguet, JI Cubero, MT Moreno, dan AM Torres. 2005. Cross-species amplification of Medicago truncatula microsatellites across three major pulse crops. Theoretical and Applied Genetik 110: 1210–1217.
- Hampson, K, SH Azam-Ali, A Sesay, SM Mukwaya, and SN Azam-Ali. 2000. Assessing Opportunities for Increased Utilisation of Bambara Groundnut In Southern Africa. Tropical Crops Research Unit, School of Biosciences, University of Nottingham.
- Jatoi SA, Kikuchi A, San-San-Yi, KW Naing, S Yamanaka, JA Watanabe, and KN Watanabe. 2006. Use of Rice SSR markers as RAPD markers for genetik diversity analysis in Zingiberaceae. Breeding Science 56: 107-111
- Lee SY, WK Fai, M Zakaria, H Ibrahim, RY Othman, JG Gwag, VR Rao, and YP Jin YP. 2007. Characterization of polymorphic microsatellite markers, isolated from ginger

- (*Zingiber officinale* Rosc.). Molecular Ecology Notes 7: 1009-1011.
- Madamba, R. 1995. Breeding bambara groundnut varieties suitable for Zimbabwean condisions. Proceedings of the workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (Vigna subterranea (L.) Verdc.) 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. 128-134
- Mulsanti, W Indria., M Surahman, S Wahyuni, dan DW Utami. 2013. Identifikasi galur tetua padi hibrida dengan marka SSR spesifik dan pemanfaatannya dalam uji kemurnian benih. Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan. 32 (1): 1-8.
- Oumouloud A, MS Arnedo-Andrés, R González-Torres, and JM Álvarez. 2009. Morphological and molecular characterization of melon accession resistant to *Fusarium* wilts. Euphytica 169: 69-79.
- Sajib AM, MM Hosain, ATMJ Moznas, H Hosain, MM Islam, MS Ali, SH Prodhan. 2012. SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatik landraces of rice (*Oryza sativa* L.). J. BioSci Biotech. 1(2):107-116.
- Setiyo, IE. 2001. Pemetaan dan keragaman genetik RAPD pada kelapa sawit sungai pancur (RISPA). Tesis S2. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.
- Solmaz I, N Sari, Y Aka-Kacar, and Y Yalcin-Mendi. 2010. The genetic characterization of Turkish watermelon (*Citrullus lanatus*) accessions using RAPD markers. Genet Resour Crop Ev 57: 763-771
- Somta P, S Chankaew, O Rungnoi, and Srinives. 2011. Genetic diversity of the Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) as assessed by SSR markers. Genome. 54(11):898-910.
- Suwanprasert, J, T Toojinda, P Srivines and S Chanprame. 2006. Hybridization technique for Bambara groundnut. Breeding Science (56): pp.125 129.