



ANALISIS HOMOGENITAS GENETIK KLON APEL (*Malus spp.*) HASIL PERBANYAKAN *EX VITRO* BERDASARKAN PENANDA SSR

Analysis of the Genetic Homogeneity of Apple (*Malus spp.*) Clones Propagated by *Ex Vitro* Culture Based on SSR Markers

Devit Purwoko ^{1*}, Pramono¹, Teuku Tajuddin¹, Rismayanti¹, Imastini Dinuriah²,
Muhamad Farkhan Yanuar ², Hidayatul Arisah³, Dita Agisimanto³

¹Balai Bioteknologi BPPT, Gd. 630 Kawasan PUSPIPTEK Setu Tangerang Selatan 15314

²Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman Jl. Profesor DR. HR Boenyamin No.708, Dukuhbandong Grendeng Purwokerto Utara Banyumas 53122

³Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No.1, Beji, Kec. Junrejo, Kota Batu, Jawa Timur 65327

*Email: devit.purwoko@bppt.go.id

ABSTRACT

Propagation of apple plants (Malus spp.) vegetatively has the advantage of genetic homogeneity between clones and their parents. However, the possibility of cytological and off-type deviations persists during mass propagation. This study aims to analyze the genetic homogeneity of apple plants using SSR markers in ex vitro propagation techniques. Morphological observations between the parental plant and the ex vitro propagation derived clones and also among themselves did not show any differences. To analyze the genetic heterogeneity of these plants, 15 SSR primers were screened on 29 propagation clones of apple var. Anna and Manalagi. Genetic characters were scored for group analysis using Darwin 6.05. Eight SSR primers (IPA 2, IPA 3, IPA 4, 5 PA, 6 PA, 12 PA, 13 PA, and 14 PA) produced 82 clear and easily visible bands in the size range of 90-365 bp. This study successfully detected the uniformity of all band patterns from the plant samples. The SSR markers could be used to analyze the genetic stability of the ex vitro propagation of apple clones.

Keywords: *apple, ex vitro, homogeneity, molecular marker, SSR*

ABSTRAK

Perbanyakan tanaman apel (*Malus spp.*) secara vegetatif memiliki keunggulan homogenitas genetik antara klon dengan induknya. Namun kemungkinan terjadi penyimpangan sitologi dan off type tetap ada saat perbanyakan massal. Penelitian ini bertujuan untuk menguji homogenitas genetik tanaman apel menggunakan penanda SSR pada teknik perbanyakan *ex vitro*. Pengamatan secara morfologi antara tanaman induk dengan hasil perbanyakan secara *ex vitro* dan dengan sesamanya tidak menunjukkan perbedaan. Untuk menganalisis homogenitas genetik tanaman ini kami menyaring 15 primer SSR pada 29 klon perbanyakan tanaman apel varietas Anna dan Manalagi. Karakter genetik dihitung untuk analisis kelompok menggunakan Darwin 6.05. Sebanyak 8 primer SSR (IPA 2, IPA 3, IPA 4, 5 PA, 6 PA, 12 PA, 13 PA, dan 14 PA) menghasilkan 82 pita yang jelas dan mudah terlihat dalam kisaran ukuran 90-365 bp. Studi ini juga berhasil mendeteksi keseragaman pola pita semua sampel tanaman. Penanda SSR dapat digunakan untuk analisis stabilitas genetik perbanyakan *ex vitro* dari tanaman apel.

Kata Kunci: *apel, ex vitro, homogenitas, penanda molekuler, SSR*

PENDAHULUAN

Apel (*Malus spp.*) merupakan tanaman tahunan subtropis yang menjadi kekayaan plasma nutfah Indonesia untuk dataran tinggi. Tanaman apel tersebut telah mengalami adaptasi panjang menjadi apel tropis yang mampu tumbuh dan berproduksi di wilayah Jawa Timur, terutama daerah Batu dan Malang. Kota Batu sangat sesuai untuk pengembangan komoditas tanaman apel dikarenakan kota batu memiliki udara yang sejuk dengan temperatur 16-17 °C dan kelembapan 75-85%, yang sesuai dengan syarat tumbuh tanaman apel (Sitompul 2007).

Pemuliaan tanaman apel tidak mudah karena sifat reproduksi *outbreeding* dan siklus regenerasi yang lama dengan jumlah kromosom yang besar ($2n = 34$) sehingga membutuhkan ruang, waktu dan biaya tidak sedikit dalam memelihara populasi bahan pemuliaannya (Maliapaard et al. 1998). Ditambah benih apel bersifat rekalsitran dengan kemampuan daya kecambah rendah, sehingga perbanyak benih unggulnya dilakukan secara vegetatif baik melalui teknik penempelan (okulasi), sambung (*grafting*), dan stek *ex vitro*. Kelebihan perbanyak vegetatif adalah homogenitas genetik antara klon dengan induknya. Walaupun diperbanyak secara vegetatif, kemungkinan terjadi penyimpangan sitologi tetap ada pada saat perbanyak massal (Mohammad et al. 2017). Penampilan tanaman klonal yang homogen secara fenotip dapat berbeda pada saat berbunga, berbuah dan tahap selanjutnya. Hal ini bisa terjadi karena timbulnya mutasi pada sekuens DNA akibat interaksi dengan hormon tumbuh ketika proses klonal. Menjaga keunggulan homogenitas dan kemurnian genetik teknik perbanyak vegetatif *ex vitro* pada saat produksi massal menjadi amat penting.

Pengujian homogenitas genetik dapat dilakukan secara konvensional melalui deskripsi morfologis, sifat fisiologis, studi sitologi, isozim (Singh et al. 2012a; Singh et al. 2012b; Muniswamy et al. 2017). Identifikasi homogenitas genetik klon apel secara konvensional sulit dilakukan untuk mendeteksi variasi yang terjadi pada perbanyak secara vegetatif, karena hampir semua klon apel dari kultivar yang sama berasal dari induk tunggal melalui pembiakan vegetatif (Sugiatno dan Agisimanto 2013).

Penampilan baik secara morfologi dan fisiologi dapat berubah dipengaruhi kondisi lingkungan (Singh et al. 2013). Penanda berbasis molekuler dapat digunakan dalam menganalisis homogenitas klonal tanaman. Penanda *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *inter simple sequence repeats* (ISSR), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *sequence characterized amplified region* (SCAR), *DNA amplification fingerprinting* (DAF), *Simple Sequence Repeat* (SSR), *arbitrarily primed polymerase chain reaction* (AP-PCR) telah digunakan dalam pengujian homogenitas beberapa spesies tanaman (Chavan et al. 2013; Meloni et al. 2013; Singh et al. 2013; Jarni et al. 2015; Chhajer dan Kalia 2016; Mohammad et al. 2016; Thakur et al. 2016; Mohammad et al. 2017).

Simple Sequence Repeat (SSR) atau juga dikenal mikrosatelit merupakan salah satu dari marka molekuler, yang terdiri atas unit pengulangan 1-6 pasang basa DNA dengan variasi yang tinggi dan tersebar pada genom prokariotik dan eukariotik (Grover et al. 2012; Kapil et al. 2014). Studi genetik pada saat ini banyak menggunakan marka mikrosatelit karena terdistribusi secara melimpah dan merata dalam genom, variabilitasnya sangat tinggi (banyak alel dalam lokus), dan sifatnya yang kodominan dengan lokasi genom yang telah diketahui (Kesawat dan Das Kumar 2009). Marka SSR telah dimanfaatkan untuk analisis keragaman genetik, identitas genetik, dan analisis kekerabatan pada tanaman monokotil seperti sagu (Purwoko et al. 2019) maupun tanaman dikotil seperti apel (Lassois et al. 2016; Gross et al. 2018). Marka SSR juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi homogenitas dan kemurnian genetik pada perbanyak tanaman (Nookaraju dan Agrawal 2012; Ashwini et al. 2015; Chhajer dan Kalia 2016; Sulistiyorini et al. 2018).

Penelitian analisis homogenitas genetik tanaman apel hasil perbanyak secara *ex vitro* berdasarkan penanda SSR belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat keseragaman tanaman apel antara progeni dengan induknya pada teknik perbanyak *ex vitro* melalui analisis homogenitas genetik dengan penanda SSR.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Bulan Februari sampai dengan April 2019 di *screen house Pilot Plant* Perbanyakan Tanaman dan Laboratorium Teknologi Gen, Balai Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Kawasan PUSPIPTEK, Tangerang Selatan.

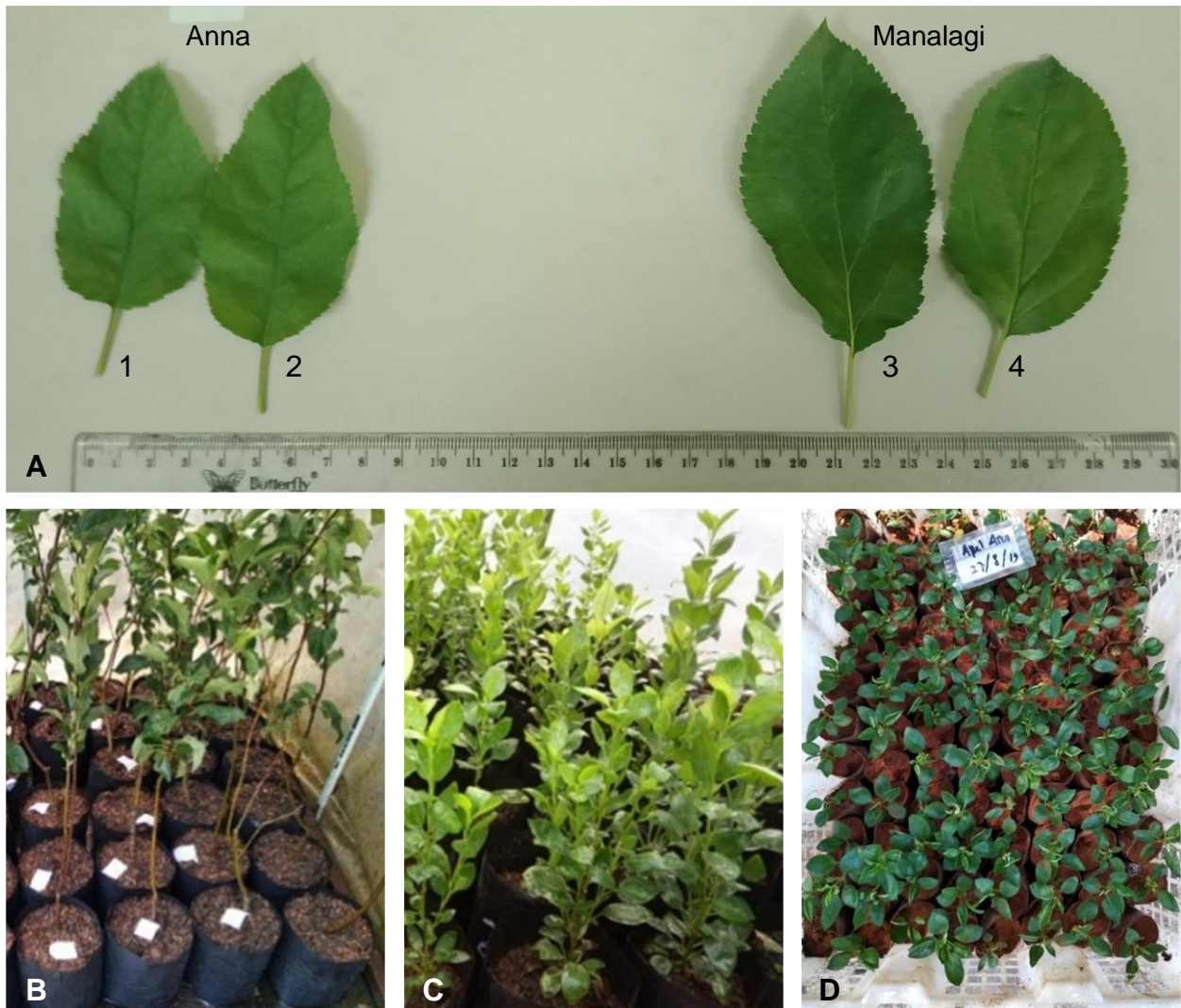
Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah peralatan isolasi DNA (mortar, waterbath, sentrifuse), mesin PCR, mesin elektroforesis dan Gel Doc. Bahan yang digunakan adalah sampel daun (Gambar 1A) 29 klon dari 2 varietas apel asal Batu Malang (Tabel 1) yaitu Anna (MIAN1, MIAN2, MIAN4, MIAN5, MIAN6,

MIAN8, MIAN9, MIAN10, ANS1, ANS2, ANS3, ANEX1, ANEX2) dan Manalagi (MN1, MN2, MN3, MN4, MIMN1, MIMN2, MIMN3, MIMN4, MIMN5, MIMN6, MIMN8, MIMN10), bahan isolasi DNA, PCR dan gel elektroforesis. Sampel yang digunakan merupakan tanaman induk, klon hasil perbanyakan *ex vitro* dan hasil penyambungan (Gambar 1B, 1C, dan 1D).

Isolasi DNA

DNA diekstraksi menggunakan metode Purwoko et al. (2019) yang dimodifikasi. Kuantifikasi DNA dilihat menggunakan agarose 1% dalam buffer TAE 0.5x pada tegangan 100 V selama 30 menit yang dielektroforesis dengan *eXU MUPID*. Standar DNA (*ladder* 1000bp) digunakan agar ukuran DNA sampel dapat diestimasi.



Gambar 1. A). Sampel daun klon Anna dan Manalagi sebagai sumber DNA (1 = daun indukan Anna; 2 = daun *ex vitro* Anna; 3 = daun indukan Manalagi; 4 = daun klonal dari indukan Manalagi); B). Indukan Klon Anna; C). Multiple Indukan Klon Anna; D). Klon Anna *Ex vitro*

Tabel 2. Karakteristik primer SSR, jumlah pita dan ukuran produk amplifikasi

Primer		Sekuen 5'-3'	TA (°C)	Jumlah Pita	Ukuran Produk (bp)
IPA 2	F	AACCCTCCGCAGACTTACAA	54.73	4	280-320
	R	ACAGCTTAATCCGCTCATGT	52.45		
IPA 3	F	CGTCCACAACACCAATTCAC	54.86	2	100-180
	R	ACTCCAGATGAGTGGGCAGT	54.71		
IPA 4	F	CTCCTTTTGCTCAGCCTGTC	55.13	2	250-280
	R	AAAGGCACTTCAGGTTTTGG	54.21		
5 PA	F	TTCGATTTTTGCCAAAGGTG	49.3	12	300-365
	R	TGGACGATTGACTTCACAGC	53.4		
6 PA	F	CGCCCCACGTTTGATATTT	50.2	20	100-150
	R	AAAGGAAGGAAAGGCAAGC	51.4		
12 PA	F	CGGCGAGAAAAAAAAACAATG	50.5	12	90-133
	R	GGATAACCGTCCCCCTCTTC	57.5		
13 PA	F	GGCACCCAAGCCCCTAA	52.2	15	132-158
	R	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	58.5		
14 PA	F	TCCCGCCATTTCTCTGC	49.8	15	124-156
	R	AAACCGCTGCTGCTGAAC	51.1		

Gel agarose diwarnai dengan GelRed® selanjutnya diamati dengan Gel Doc dan didokumentasikan. Pengukuran konsentrasi dan kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan NanoDrop. Apabila kualitas DNA yang dihasilkan memiliki kemurnian antara 1,8 hingga 2 berarti tidak ada komponen kontaminasi RNA, maka DNA memenuhi persyaratan untuk proses lanjutan pada tahap amplifikasi PCR.

Amplifikasi SSR dan analisa data

Seleksi primer SSR dilakukan terhadap 15 primer (Tabel 2) pada 2 varietas apel (Anna dan Manalagi) untuk memperoleh primer-primer yang polimorfik. Komposisi PCR dibuat dengan total 25 µL/reaksi terdiri atas DNA sampel (1 µL), *Go Taq Green Master Mix* (12,5 µL), primer *forward* (1 µL), primer *reverse* (1 µL), dan H₂O steril hingga volume 25 µL. Larutan kemudian dicampur secara perlahan dan disentrifugasi singkat untuk menurunkan seluruh cairan di dalam tabung. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan PCR. Program yang digunakan adalah sebagai berikut: satu siklus 95 °C selama 3 menit, 35 siklus 95 °C selama 30 detik untuk *denaturasi*, 35 siklus T_m-5 °C selama 30 detik untuk *annealing* dan 35 siklus 72 °C selama 30 detik serta *final ekstension*

72 °C selama 60 menit dan diakhiri dengan suhu 4 °C. Amplifikasi PCR menggunakan mesin PCR Tommy.

Separasi hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel *Methapor Agarose* 3% menggunakan Buffer TAE 1x. Gel *Methapor Agarose* lebih mudah penggunaannya dibanding gel akrilamid. Setiap produk PCR dicampur dengan loading dye kemudian didenaturasi selama 10 menit lalu diletakkan dalam es yang sudah dihancurkan. Elektroforesis dilakukan pada 50 W selama 5 jam dan *ladder* 1000 bp digunakan sebagai penanda ukuran DNA selanjutnya pita yang dihasilkan diamati menggunakan Gel Doc.

Untuk memastikan konsistensi hasil, semua reaksi dilakukan dua kali. Hanya pola pita ampikon jelas diproduksi secara konsisten dan tidak ambigu yang diberi skor secara manual. Analisis pita SSR dilakukan dengan memberi skoring dari pita yang terbentuk dari hasil PCR masing-masing sampel, pita yang muncul pada gel diberi kode 1 dan yang tidak muncul diberi kode 0. Perangkat lunak *Dissimilarity Analysis and Representation for WINDOWS* (DARWin) versi 6.05 (Perrier dan Jacquemoud-Collet 2006; <http://darwin.cirad.fr/darwin>) digunakan untuk mengevaluasi asosiasi genetik dengan

Tabel 1. Kualitas dan kuantitas DNA klon tanaman apel

No	Kode Sampel	Sumber Eksplan	Konsentrasi	A260/280
1	MN1	indukan	441,5	1,98
2	MN2	indukan	975,9	1,94
3	MN3	indukan	400,86	1,93
4	MN4	indukan	708,33	1,9
5	MIMN1	perbanyak indukan	2699,37	1,99
6	MIMN2	perbanyak indukan	1188,17	2,03
7	MIMN3	perbanyak indukan	845,53	2,07
8	MIMN4	perbanyak indukan	3056,61	1,97
9	MIMN5	perbanyak indukan	337,67	1,98
10	MIMN6	perbanyak indukan	720,98	2,02
11	MIMN8	perbanyak indukan	912,07	1,99
12	MIMN10	perbanyak indukan	427,11	1,78
13	AN1	indukan	261,2	2,03
14	AN2	indukan	282,5	2,03
15	AN3	indukan	79,3	2,03
16	AN5	indukan	87,2	2,24
17	MIAN1	perbanyak indukan	363,38	1,85
18	MIAN2	perbanyak indukan	1384,62	2
19	MIAN4	perbanyak indukan	216,87	1,85
20	MIAN5	perbanyak indukan	1346,64	2,07
21	MIAN6	perbanyak indukan	1097,35	2,16
22	MIAN8	perbanyak indukan	249,71	2,24
23	MIAN9	perbanyak indukan	704,6	1,93
24	MIAN10	perbanyak indukan	405,32	1,91
25	ANS1	sambung	538,48	1,88
26	ANS2	sambung	663,16	2,06
27	ANS3	sambung	550,55	1,90
28	ANEX1	teknik <i>ex vitro</i>	1482,29	1,96
29	ANEX2	teknik <i>ex vitro</i>	1916,13	1,99

menghitung koefisien kesamaan Jaccard untuk perbandingan berpasangan berdasarkan proporsi pita bersama yang diproduksi oleh primer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA tanaman apel

Kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi sampel daun klon-klon apel diukur untuk mengetahui konsentrasi dan kemurniannya (Tabel1). Hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi DNA bervariasi dengan rata-rata 816,56 ng μL^{-1} . Konsentrasi

tertinggi diperoleh dari klon MIMN4 yaitu 3056,61 ng μL^{-1} sedangkan AN3 hanya 79,3 ng μL^{-1} , terendah dibandingkan konsentrasi dari klon lainnya. Kemurnian DNA diperoleh dengan mengukur rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm menggunakan NanoDrop. Nilai kemurnian DNA yang baik berada pada kisaran 1,8–2,0 (NanoDrop 2007). Rata-rata kemurnian DNA hasil isolasi daun klon-klon apel yaitu 2,00 dengan rentang tertinggi dan terendah bernilai 2,24 dan 1,78 (Tabel 1). Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dari klon-klon apel secara umum cukup baik.

Validasi dan amplifikasi SSR

Pengenceran DNA sampel dilakukan sebelum proses amplifikasi menjadi masing-masing 50 ng μL^{-1} . Sebanyak 15 primer divalidasi menggunakan 2 varietas apel, yaitu Anna dan Manalagi. Berdasarkan hasil validasi diperoleh 8 primer yang menghasilkan pita berulang pada semua sampel sehingga dapat digunakan pada tahap selanjutnya (Tabel 2). Delapan primer tersebut digunakan untuk pengujian homogenitas klon apel hasil perbanyakan secara *ex vitro*. Suhu *annealing* optimal untuk penanda SSR beragam dari 49,3 hingga 58,5°C (Tabel 2). Delapan primer SSR menghasilkan 82 pita yang jelas dan mudah terlihat dalam kisaran ukuran 90-365 bp (Tabel 2). Semua primer menghasilkan 2 hingga 20 pita per primer dengan rata-rata 10,25 pita. Primer IPA 3 dan IPA 4 menghasilkan 2 pita pada semua sampel sedangkan primer 6 PA menghasilkan pita paling banyak yaitu 20.

Separasi hasil amplifikasi SSR dilakukan menggunakan *Metaphor Agarose* 3%. Hasil separasi amplifikasi SSR menunjukkan adanya beberapa sampel yang tidak menghasilkan pita pada primer tertentu. Hal ini terjadi karena tidak teramplifikasinya primer dengan DNA genom dan sekuen DNA genom tidak komplementer dengan urutan basa pada primer tersebut. Menurut Randriani et al. (2012), primer yang tidak menghasilkan pita DNA disebabkan oleh tidak ada sekuen komplementer pada DNA genom atau hanya satu untai yang mengandung sekuen komplementer dengan primer tersebut. Pita yang muncul pada gel agarosa pada setiap lokus diasumsikan sebagai alel mikrosatelit. Jika masing-masing pita dianggap sebagai alel untuk lokus atau primer tersebut, maka masing-masing sampel tanaman yang diperiksa ada yang bersifat homozigot yaitu dengan satu pita atau heterozigot yaitu mempunyai dua pita untuk lokus yang diuji (Megia dan Djuita 2010). Menurut Syafaruddin dan Santoso (2011) bahwa ukuran fragmen DNA yang teramplifikasi tergantung daerah yang diapit oleh dua primer dalam arah bolak-balik.

Produk amplifikasi memiliki variasi intensitas pita yang berbeda diduga disebabkan oleh perbedaan jumlah salinan amplifikasi yang dipengaruhi oleh

keberadaan pengulangan sekuens tertentu dalam genom. Menurut Kalle et al. (2014), jumlah dan intensitas pita DNA yang dihasilkan sangat tergantung pada kemampuan primer mengenali urutan DNA komplementernya pada cetakan DNA yang digunakan.

Intensitas pita DNA hasil amplifikasi pada setiap primer dipengaruhi oleh kemurnian dan konsentrasi DNA templat. DNA templat yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang redup. Menurut Gusmiaty et al. (2012), perbedaan DNA hasil amplifikasi disebabkan adanya persebaran lokasi basa nukleotida di dalam genom yang menjadi tempat atau situs penempelan primer. Jarak antar situs amplifikasi ini menghasilkan fragmen DNA dengan berbagai ukuran pasang basa. Pengaturan temperatur pada penempelan primer dan waktu dari masing-masing reaksi mempengaruhi hasil amplifikasi. Hasil PCR yang baik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kemurnian hasil ekstraksi DNA, ketepatan pemilihan primer yang digunakan serta ketepatan kondisi PCR (Gaina dan Francis 2021). Apabila konsentrasi DNA terlalu rendah akan menghasilkan fragmen sebagai pita yang sangat tipis pada gel atau bahkan pita tidak terlihat secara visual. Sebaliknya, konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu pita dengan pita yang posisinya berdekatan (Nurhaimi-Haris et al. 2003).

Homogenitas genetik klon apel

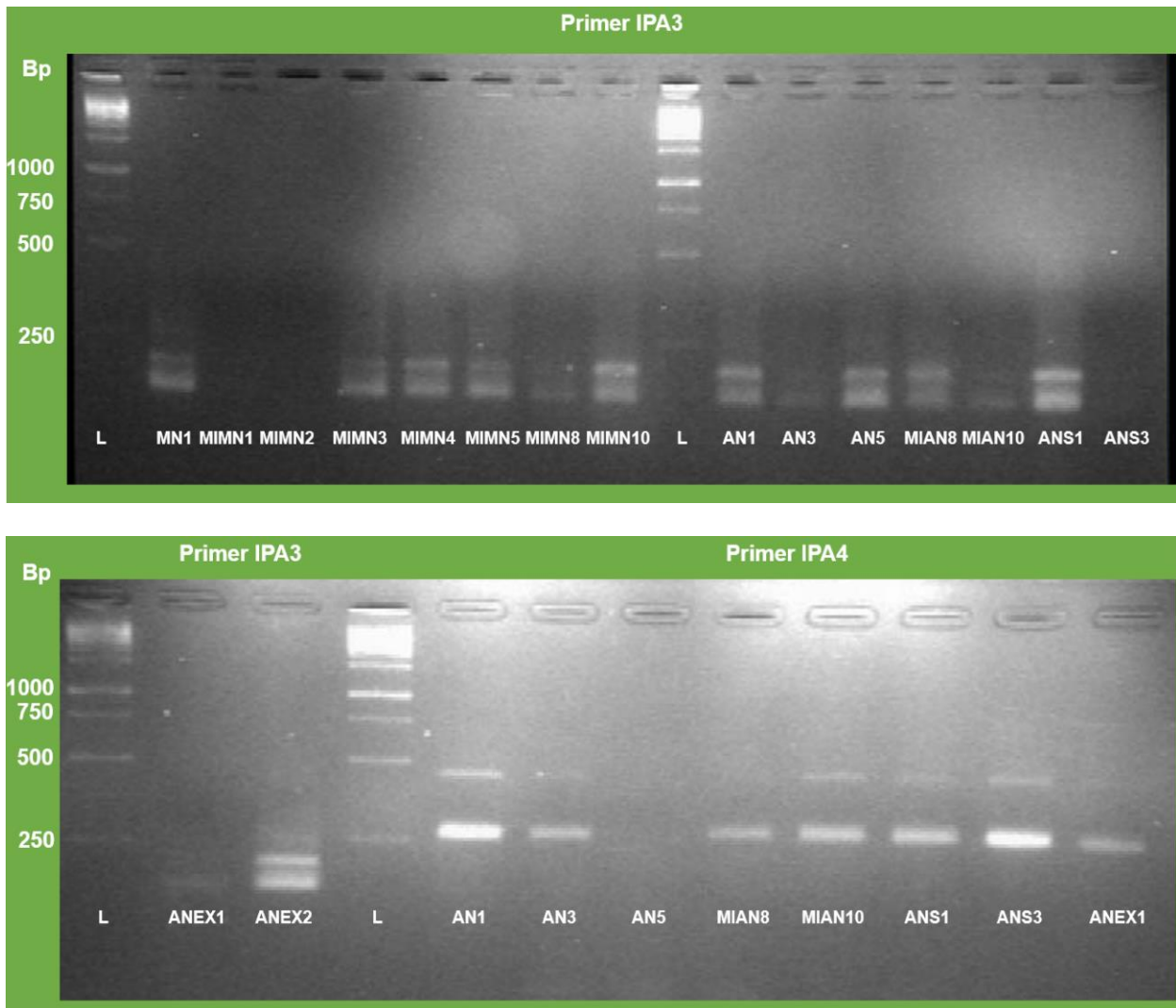
Perbanyakan tanaman apel dapat dilakukan secara vegetatif dan generatif. Perbanyakan tanaman apel yang baik dan umum dilakukan adalah perbanyakan vegetatif, sebab perbanyakan generatif memakan waktu lama dan sering menghasilkan bibit yang menyimpang dari induknya. Perbanyakan vegetatif tanaman apel dilakukan melalui teknik penempelan (okulasi), sambung (*grafting*), stek *ex vitro*.

Penggunaan bahan perbanyakan klon terus-menerus dalam skala besar membutuhkan pengujian berkala terkait kestabilan homogenitas genetik baik tanaman induk maupun klon hasil

perbanyak. Perbanyak terus menerus memiliki potensi adanya variasi somaklonal, perubahan akibat bahan mutagenik, efek sitoplasma dan tercampurnya klon yang berbeda ketika produksi skala besar. Sehingga pengujian homogenitas genetik menjadi penting dilakukan untuk menjaga kualitas produksi klon apel unggul. Pada perbanyak tanaman secara massal, informasi kestabilan genetik suatu klon sangat penting diketahui untuk memastikan homogenitas genetik dari suatu tanaman, menjaga karakteristik klon tersebut, serta untuk konservasi plasma nutfah (Cruz-Martínez et al. 2017). Pengujian homogenitas dapat dilakukan melalui identifikasi karakter morfologi dan molekuler. Pengujian homogenitas tanaman dengan karakter morfologi sering tidak pasti karena pengaruh lingkungan, sedang pengujian dengan karakter molekuler dapat mendeteksi

kesalahan label atau adanya tanaman *off-type* (Sulistiyorini et al. 2018).

Homogenitas atau keseragaman genetik klon apel secara molekuler dapat dilihat dari pola pita yang dihasilkan dari amplifikasi marka SSR. Pola pita yang dihasilkan menggambarkan letak alel dari masing-masing klon. Klon dengan pola pita yang sama menunjukkan klon memiliki alel yang sama. Pada penelitian ini, 8 marka SSR yang digunakan berhasil mendeteksi keseragaman pola pita semua sampel tanaman pada dua klon apel antara tanaman induk dengan klonalnya, yaitu Anna (MIAN1, MIAN2, MIAN4, MIAN5, MIAN6, MIAN8, MIAN9, MIAN10, ANS1, ANS2, ANS3, ANEX1, ANEX2) dan Manalagi (MN1, MN2, MN3, MN4, MIMN1, MIMN2, MIMN3, MIMN4, MIMN5, MIMN6, MIMN8, MIMN10). Gambar 2 menunjukkan profil SSR yang dihasilkan oleh penanda IPA 3 dari induk tanaman apel

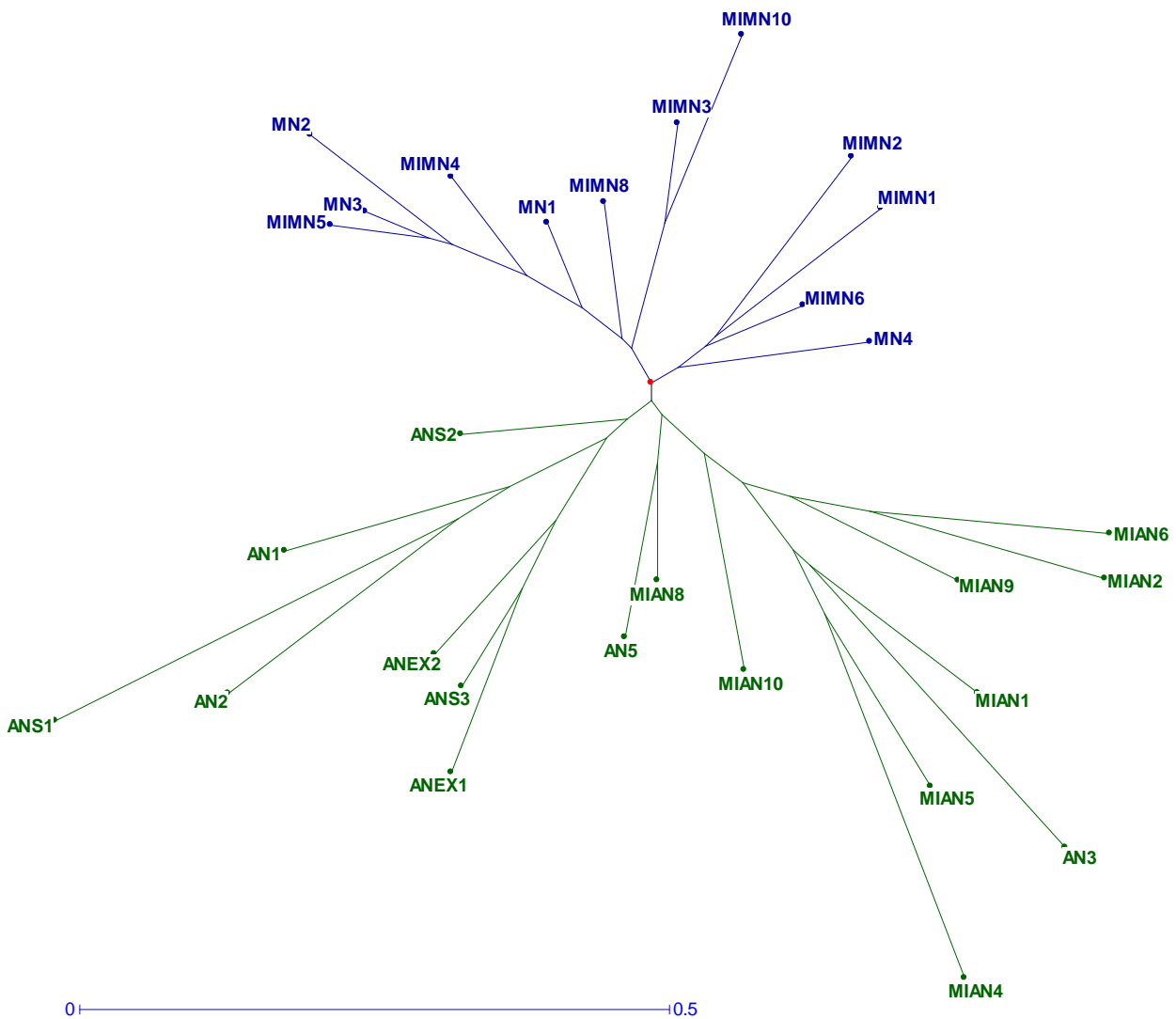


Gambar 2. Contoh alel hasil amplifikasi primer IPA3 dan IPA4 yang menghasilkan pola pita seragam

Manalagi (MN1) identik dengan MIMN3, MIMN4, MIMN5 dan MIMN10. Pada penanda IPA 4, profil SSR induk tanaman apel Anna (AN1) identik dengan MIAN8, MIAN10, ANS1, ANS3 dan ANEX1. Semua pita yang diproduksi dari tanaman yang diturunkan secara *ex vitro* bersifat monomorfik dan sebanding, yaitu memiliki pola pita sejajar dengan ukuran yang sama dengan tanaman induk (Gambar 2). Hasil ini sejalan dengan laporan sebelumnya tentang deteksi homogenitas genetik perbanyakan tanaman menggunakan penanda SSR pada spesies tanaman lain termasuk *Cocos nucifera* (Bandupriya et al. 2017), *Solanum tuberosum* (Tiwari et al. 2013), *Saccharum officinarum* (Pandey et al. 2012), dan *Psidium guajava* (Rai et al. 2012).

Analisis penanda molekuler menunjukkan bahwa tanaman induk dan turunan klonalnya dapat dikelompokkan

bersama dalam satu kelompok. Analisis DNA mengungkapkan kesamaan 100% antara tanaman induk dan turunannya oleh penanda SSR, hal ini menunjukkan tidak adanya keragaman yang dapat dideteksi, atau dengan kata lain keturunan yang *true-to-type* (Tiwari et al. 2013). Berdasarkan pohon filogenetik apel tersebut dapat dikelompokkan menjadi 2 kelompok utama, kelompok pertama tanaman induk dan hasil perbanyakan klon Manalagi dan kelompok kedua tanaman induk dan hasil perbanyakan klon Anna (Gambar 3). Analisis dendrogram berdasarkan koefisien kesamaan Jaccard mengungkapkan 100% kesamaan genetik antara tanaman induk dan turunannya. Menurut Sousa Azevedo et al. (2012) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa terdapat beberapa aksesori yang menunjukkan koefisien kesamaan yang sama yaitu 1 dan terdapat pada kelompok yang sama, hal tersebut



Gambar 3. Dendrogram 29 klon tanaman apel berdasarkan 8 primer SSR

menunjukkan aksesi tersebut memiliki satu garis keturunan dan tidak menutup kemungkinan merupakan aksesi yang sama walaupun berbeda namanya.

KESIMPULAN

Penelitian ini menjelaskan penggunaan penanda berbasis sistem PCR (SSR) untuk penilaian stabilitas genetik perbanyakan *ex vitro* dari tanaman apel (*Malus spp*). Produksi pita monomorfik dengan penanda berbasis SSR dapat dilihat dari klon tanaman apel yang diperbanyak secara *ex vitro* (ANEX1 dan ANEX2) melalui pohon induk maupun dengan teknik penyambungan (ANS1, ANS2, dan ANS3). Hal ini sebagai konfirmasi bahwa tanaman yang diproduksi melalui perbanyakan *ex vitro* menghasilkan klon dengan tipe dan sifat yang sama dengan tanaman induknya. Dengan demikian teknik *ex vitro* dapat membantu mengisi kebutuhan bibit tanaman berkualitas dalam jumlah besar dengan kepastian keseragaman genetik yang sama dengan induknya. Penelitian ini masih perlu diuji menggunakan marka genetik lainnya dan jumlah tanaman hasil *ex vitro* yang lebih banyak dengan mempertimbangkan frekuensi perbanyakan setiap indukan untuk hasil yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami disampaikan kepada kepala *Pilot Plant* Mikropropagasi Balai Bioteknologi-BPPT yang telah memberi ijin dan mendukung penelitian ini dengan bahan tanamannya.

DAFTAR PUSTAKA

Ashwini AM, Ramakrishnaiah H, Manohar SH, Majumdar M (2015) An efficient multiple shoot induction and genetic fidelity assessment of *Exacum bicolor* Roxb., an endemic and endangered medicinal plant. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51: 659-668. doi: 10.1007/s11627-015-9726-5

Bandupriya HDD, Iroshini WWMA, Perera SACN, Vidhanaarachchi VRM, Fernando SC, Santha ES, Gunathilake TR (2017) Genetic fidelity testing using SSR marker assay confirms trueness to type of micropropagated coconut (*Cocos*

nucifera L.) plantlets derived from unfertilized ovaries. *Open Plant Sci J* 10: 46-54. doi: 10.2174/1874294701710010046

- Chavan JJ, Gaikwad NB, Yadav SR (2013) High multiplication frequency and genetic stability analysis of *Ceropegia panchganiensis*, a threatened ornamental plant of Western Ghats: conservation implications. *Sci Hortic* 161: 134-142. doi: 10.1016/j.scienta.2013.06.042
- Chhajer S, Kalia RK (2016) Evaluation of genetic homogeneity of in vitro-raised plants of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem. using molecular markers. *Tree Genet Genomes* 12: 100. doi: 10.1007/s11295-016-1057-0
- Cruz-Martínez V, Castellanos-Hernández OA, Acevedo-Hernández GJ, Torres-Morán MI, Gutiérrez-Lomelí M, Ruvalcaba-Ruiz D, Zurita F, Rodríguez-Sahagún A (2017) Genetic fidelity assessment in plants of *Sechium edule* regenerated via organogenesis. *S Afr J Bot* 112: 118–122. doi: 10.1016/j.sajb.2017.05.020
- Gaina CD, Francis FBH (2021) Amplifikasi DNA kandidat gen kuda pacu Sumba. *J Kajian Vet* 9: 13-20. doi: 10.35508/jkv.v9i1.3901
- Gross BL, Wedger MJ, Martinez M, Volk GM, Hale C (2018) Identification of unknown apple (*Malus x domestica*) cultivars demonstrates the impact of local breeding program on cultivar diversity. *Genet Resour Crop Evol* 65: 1317-1327. doi: 10.1007/s10722-018-0625-6
- Grover A, Aishwarya V, Sharma PC (2012) Searching microsatellites in DNA sequences: approaches used and tools developed. *Physiol Mol Biol Plants* 18: 11-19. doi: 10.1007/s12298-011-0098-y
- Gusmiaty, Restu M, Pongtuluran I (2012) Seleksi primer untuk analisis keragaman genetik jenis bitti (*Vitex coffassus*). *J Perennial* 8: 25-29. doi: 10.24259/perennial.v8i1.211
- Jarni K, Jakše J, Brus R (2015) Vegetative propagation: linear barriers and somatic mutation affect the genetic structure of a *Prunus avium* L. stand. *Forestry* 88: 612–621. doi: 10.1093/forestry/cpv029
- Kalle E, Kubista M, Rensing C (2014) Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif* 2: 11-29. doi:

- 10.1016/j.bdq.2014.11.002
- Kapil A, Rai PK, Shanker A (2014) ChloroSSRdb: a repository of perfect and imperfect chloroplastic simple sequence repeats (cpSSRs) of green plants. Database (Oxford) 2014: bau107. doi: 10.1093/database/bau107
- Kesawat MS, Das Kumar B (2009) Molecular markers: It's application in crop improvement. J Crop Sci Biotechnol 12: 169–181. doi: 10.1007/s12892-009-0124-6
- Lassois L, Denancé C, Ravon E, Guyader A, Guisnel R, Hibrand-Saint-Oyant L, Poncet C, Lasserre-Zuber P, Feugey L, Durel CE (2016) Genetic diversity, population structure, parentage analysis, and construction of core collections in the French Apple Germplasm based on SSR markers. Plant Mol Biol Rep 34: 827-844. doi: 10.1007/s11105-015-0966-7
- Maliepaard C, Alston FH, van Arkel G, Brown LM, Chevreau E, Dunemann F, Evans KM, Gardiner S, Guilford P, van Heusden AW, Janse J, Laurens F, Lynn JR, Manganaris AG, den Nijs APM, Periam N, Rikkerink E, Roche P, Ryder C, Sansavini S, Schmidt H, Tartarini S, Verhaegh JJ, Vrieling-van Ginkel M, King GJ (1998) Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. Theor Appl Genet 97: 60–73. doi: 10.1007/s001220050867
- Megia R, Djuita R (2010) Deteksi integritas genomik pisang hasil iradiasi *in vitro* berdasarkan penanda mikrosatelit. J Makara Sains 14: 151-157. doi: 10.7454/mss.v14i2.728
- Meloni M, Reid A, Caujapé-Castells J, Marrero A, Fernández-Palacios JM, Mesa-Coelo RA, Conti E (2013) Effects of clonality on the genetic variability of rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. Ecol Evol. 3: 1569-1579. doi: 10.1002/ece3.571
- Mohammad N, Vaishnav V, Mishra J, Mahesh S, Kumar P, Ansari SA (2016) Genetic fidelity testing in micropropagated plantlets of *Albizia procera* (Roxb.) using RAPD and ISSR markers. Indian Forester 142: 558–562
- Mohammad N, Dahayat A, Pardhi Y, Mishra Y, Shirin F (2017) Testing of genetic homogeneity of elite eucalyptus clones using DNA marker. Trop Plant Res 4): 391–395. doi: 10.22271/tpr.2017.v4.i3.051
- Muniswamy B, Kosaraju B, Mishra MK, Yenugula R (2017) Field performance and genetic fidelity of micropropagated plants of *Coffea canephora* (Pierre ex A. Froehner). Open Life Sci 12: 1-11. doi: 10.1515/biol-2017-0001
- NanoDrop (2007) ND-1000 Spectrophotometer V3.5 user's manual. NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, Delaware USA
- Nookaraju A, Agrawal DC (2012) Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. S Afr J Bot 78: 302–306. doi: 10.1016/j.sajb.2011.08.009
- Nurhaimi-Haris, Aswidinnoor H, Toruan-Mathius N, Purwantara A (2003) Kemiripan genetik klon karet (*Hevea brasiliensis* MUELL. ARG.) berdasarkan metode *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP). J Menara Perkebunan 71: 1-15. doi: 10.22302/iribb.jur.mp.v71i1.180
- Pandey RN, Singh SP, Rastogi J, Sharma ML, Singh RK (2012) Early assessment of genetic fidelity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) plantlets regenerated through direct organogenesis with RAPD and SSR markers. Aust J Crop Sci 6: 618-24
- Perrier X, Jacquemould-Collet JP (2006) DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Purwoko D, Cartealy IC, Tajuddin T, Dinarti D, Sudarsono S (2019) SSR identification and marker development for sago palm based on NGS genome data. Breed Sci 69: 1-10. doi: 10.1270/jsbbs.18061
- Rai MK, Phulwaria M, Harish, Gupta AK, Shekhawat NS, Jaiswal U (2012) Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. Plant Cell Tiss Organ Cult 111: 259-264. doi: 10.1007/s11240-012-0190-1
- Randriani E, Tresniawati C, Syafaruddin (2012) Pemanfaatan teknik random amplified polymorphic DNA (RAPD) untuk pengelompokan secara genetik plasma nutfah jambu mete (*Anacardium*

- occidentale* L.). Bul Ristri 3: 1-6. doi: 10.21082/jtidp.v3n1.2012.p1-6
- Singh SR, Dalal S, Singh R, Dhawan AK, Kalia RK (2012a) Micropropagation of *Dendrocalamus asper* {Schult & Schult F} Backer ex K Heyne): an exotic edible bamboo. J Plant Biochem Biotechnol 21: 220–228. doi: 10.1007/s13562-011-0095-9
- Singh SR, Dalal S, Singh R, Dhawan AK, Kalia RK (2012b) Seasonal influences on *in vitro* bud break in *Dendrocalamus hamiltonii* Arn. Ex Munro nodal explants and effect of culture microenvironment on large scale shoot multiplication and plantlet regeneration. Indian J Plant Physiol 17: 9–21
- Singh SR, Dalal S, Singh R, Dhawan AK, Kalia RK (2013) Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult F) Backer ex K Heyne using DNA-based markers. Acta Physiol Plant 35: 419–430. doi: 10.1007/s11738-012-1084-x
- Sitompul SM (2007) Kendala produktivitas tanaman apel (*Malus sylvestris* Mill) di wilayah Malang Raya. Seminar Hasil Penelitian PHK A2, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang
- Sousa Azevedo AL, Costa PP, Machado JC, Machado MA, Pereira AV, José da Silva Léo F (2012) Cross species amplification of *Pennisetum glaucum* microsatellite markers in *Pennisetum purpureum* and genetic diversity of napier grass accessions. Crop Sci 52: 1776-1785. doi: 10.2135/cropsci2011.09.0480
- Sugiyatno A, Agisimanto D (2013) Analisis keragaman plasmanutfah apel (*Malus pumila* Mill) dengan primer Inter-Simple Sequence Repeat polymerase chain reaction.(*Online*). <http://balitjestro.litbang.pertanian.go.id/analisis-keragaman-plasmanutfah-apel-malus-pumila-mill-dengan-primer-inter-simple-sequence-repeat-polymerase-chain-reaction/>. Diakses pada 4 Januari 2019
- Sulistiyorini I, Rubiyo, Sudarsono (2018) Evaluasi keseragaman klonal pada enam klon kakao unggul berdasarkan marka SSR. J Tanaman Industri Penyebar 5: 135-144. doi: 10.21082/jtidp.v5n3.2018.p135-144
- Syafaruddin S, Santoso TJ (2011) Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). J Littri 17: 11-17. doi: 10.21082/littri.v17n1.2011.11-17
- Thakur J, Dwivedi MD, Sourabh P, Uniyal PL, Pandey AK (2016) Genetic homogeneity revealed using SCoT, ISSR and RAPD markers in micropropagated *Pittosporum eriocarpum* Royle- an endemic and endangered medicinal plant. PLoS ONE 11: e0159050. doi: 10.1371/journal.pone.0159050
- Tiwari JK, Chandel P, Gupta S, Gopal J, Singh BP, Bhardwaj V (2013) Analysis of genetic stability of *in vitro* propagated potato microtubers using DNA markers. Physiol Mol Biol Plants 19: 587-595. doi: 10.1007/s12298-013-0190-6