

**POLIMORFISME KLON KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
DARI PERKEBUNAN RAKYAT KABUPATEN SIGI**

**POLYMORPHISME OF CACAO Clones(*Theobroma cacao* L.)
FROM LOCAL FARMING OF SIGI REGION**

Rifka^{1*}, Nurul Aisyah¹, Muslimin², I Nengah Suwastika¹

¹Lab. Bioteknologi Jur. Biologi Fakultas MIPA, Universitas Tadulako

²Lab. Bioteknologi Fakultas Kehutanan, Universitas Tadulako

ABSTRACT

Analysis of cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotype character on molecular level was the first important step in plant breeding, and in order to produce the superior cocoa clones for commercial purposes. The diversity of cocoa in several local cocoa farming of Sigi Region showed the high phenotype and genotype variations. There were more than 12 cocoa clones identified over the farm. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), a PCR-based molecular markers were widely used in identifying the plant diversity. Information of primers for RAPD analysis on cocoa, especially in Sigi district had not been reported yet. Here we performed RAPD primers selection which suitable to local cocoa. The result showed that there were three primers; TCH05, AS9870 and TCM20, that could be used in identifying on sub species level of cocoa from these region, except for close related clones of Sulawesi 1 and Sulawesi 2 clones.

Keywords: *Theobroma cacao*. L, genotype, RAPD, polymorphisme

ABSTRAK

Analisis karakter genotip kakao (*Theobroma cacao* L.) pada tingkat molekular (DNA) penting dilakukan sebagai langkah awal dalam pemuliaan tanaman untuk menghasilkan klon kakao unggul. Keanekaragaman kakao di perkebunan rakyat Kabupaten Sigi memiliki variasi fenotip dan genotip yang tinggi. Terdapat lebih dari 12 klon kakao yang dapat ditemukan di perkebunan tersebut. RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) merupakan salah satu penanda molekular berbasis PCR yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi keragaman tanaman. Informasi mengenai jenis primer untuk analisis RAPD pada tanaman kakao khususnya di wilayah Kabupaten Sigi belum pernah dilaporkan. Hasil penelitian ini menunjukkan ketiga primer yaitu TCH05, AS9870 dan TCM20 dapat digunakan dalam mendeteksi variasi genetik setiap klon, kecuali klon Sulawesi 1 dan Sulawesi 2.

Kata Kunci: *Theobroma cacao*. L, genotip, RAPD, polimorfisme.

I. LATAR BELAKANG

Pengembangan kakao (*Theobroma cacao*. L) umumnya dikembangkan melalui perkebunan kakao rakyat. Perkebunan kakao rakyat Sulawesi Tengah salah satunya terdapat di Kabupaten Sigi. Keanekaragaman genotip kakao di perkebunan tersebut sangat bervariasi. Dari hasil survey di lapangan, klon-klon kakao yang ditemukan antara lain Irian, Sulawesi 1, Sulawesi 2, Panter, ICS 60, ICRR1 1, ICCRI 2, ICCRI 3, ICCRI 4, M01, M05, Asahan, Lokal Palolo, Lokal Sidondo dan Mulia.

Kakao memiliki ukuran genom yang termasuk kecil. Genom kakao diperkirakan sekitar 415 Mbp dengan jumlah kromosom sebanyak 20 buah (Figueira *et al.*, 1992). Ukuran genom kakao yang kecil memudahkan untuk melakukan pemetaan gen dan mengetahui karakter genotip tanaman tersebut. Analisis pada tingkat molekular (DNA) penting dilakukan untuk memperoleh data yang lebih komprehensif sehingga dapat digunakan untuk kepentingan lebih lanjut sebagai pembantu seleksi maupun pemetaan gen yang dapat berguna untuk mencari keterkaitan dengan sifat tertentu (Prana dan Hartati, 2003).

Saat ini pemetaan terhadap gen yang memiliki sifat-sifat penting pada tanaman kakao telah dilaporkan (Argout *et al.*, 2011). Analisis keanekaragaman

genetik kakao telah dilakukan melalui deskripsi morfologi (Engels *et al.*, 1980; Santos *et al.*, 2012), microsattellites atau SSRs (Serenio *et al.*, 2006; Motamayor *et al.*, 2008; Trognitz *et al.*, 2011; Aragon *et al.*, 2012), RFLP (Goran *et al.*, 1994; Risterucci *et al.*, 2000) dan RAPD (Figueira *et al.*, 1992; Figueira *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1995; Lea, 2004). Dari metode tersebut RAPD adalah salah satu teknik yang tepat untuk mempelajari keragaman populasi kakao (Goran *et al.*, 1994). Meskipun memiliki beberapa kekurangan, metode RAPD telah terbukti sangat efektif dan efisien dalam analisis genetik *T.cacao*L. dan spesies heterozigot lainnya (Kuhn *et al.*, 1995).

Keberhasilan amplifikasi DNA genom menggunakan teknik RAPD sangat ditentukan oleh urutan basa primer yang digunakan serta kualitasnya atau kandungan primer dalam setiap reaksi (Gusmiaty *etal.*, 2012). Informasi mengenai jenis primer untuk analisis RAPD pada tanaman kakao khususnya di wilayah Kabupaten Sigibelum pernah dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukanlah penelitian untuk menguji kompatibilitas beberapa primer RAPD pada tanaman kakao di wilayah Kabupaten Sigi.

II. BAHAN DAN METODE

Bahan tanam.

Dalam penelitian digunakan 10 klon kakao yang berasal dari dua lokasi berbeda (desa Bakubakulu dan desa Sidondo III). Klon dari desa Bakubakulu meliputi: a) ICCRI 1 Palolo; b) ICCRI 3 Palolo; c) Sulawesi 1; d) Sulawesi 2; e) Lokal Palolo. Klon dari desa Sidondo III meliputi: a) ICCRI 1 Sidondo; b) ICCRI3 Sidondo; c) ICCRI 4 Sidondo; d) Lokal Sidondo; e) M01.

Ekstraksi DNA.

Daun muda yang berasal dari perkebunan, dikumpulkan dilaboratorium, dibilas dengan air mengalir, dan ditimbang seberat 100mg. Daun dibekukan dengan *liquidnitrogen* dan digerus menggunakan *mortar* dan *pestle* hingga menjadi bubuk. Langkah selanjutnya sesuai dengan prosedur dalam *Qiagen: DNeasy® Plant Mini Kit Handbook*.

Polymerase Chain Reaction (PCR) - Random amplified polymorphic DNA (RAPD).

Prosedur amplifikasi yang dilakukan berdasarkan instruksi manual *Quick Taq HS Dye Mix 1106* dengan beberapa modifikasi. Volume reaksi total adalah 20 µl, terdiri dari 20 ng *templateDNA*, 10 µl *Quick Taq® HS DyeMix (Toyobo)*, dan 0.2 pmol *primerRAPD*. Primer yang digunakan dalam penelitian ini memiliki urutan basa

Polimorfisme Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dari Perkebunan Rakyat Kabupaten Sigi
(Rifka dkk)

sebagai berikut:

- 1)TCH05(AGTCGTCCCC);
- 2)AS9870(TTCCCCGCCC);3)TCM20(AGGTCTTGGG).

Amplifikasi dilakukan mengikuti tahap: *pradenaturasion*(94°C selama 2 menit),*denaturasion*(94°C selama 30 detik), *annealing*(30°C selama 30 detik), *extension*(68°C selama 3 menit)dilakukan pengulangan sebanyak 30x.Produk amplifikasi dipisahkan dengan elektroforesis pada 1% gel agarose dalam *TAE buffer 1x* dan diwarnai dengan *Ethidium Bromida*.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemisahan fragmen DNA diperoleh 36 pita yang berbeda, dengan jumlah rata-rata 12 pita DNA yang dihasilkan setiap primer. Primer yang menghasilkan pita amplifikasi terbanyak yaitu primer AS9870 dengan 13 pita disusul primer TCH05 dan TCM20. Tabel 1 menunjukkan pita-pita DNA yang muncul diterjemahkan ke dalam data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita DNA yang teramplifikasi.

Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari amplifikasi dengan menggunakan primer-primer tersebut bervariasi dari 650 bp sampai dengan 3500 bp. Jumlah pita DNA yang dihasilkan juga bervariasi pada masing-masing primer dan klon. Dari 29 total pita DNA yang

dihasilkan semuanya merupakan pita polimorfik. Tabel 2 menunjukkan jumlah dan ukuran pita DNA yang dihasilkan masing-masing primer RAPD.

Tidak semua primer bisa menghasilkan produk amplifikasi. Dari sepuluh klon kakao yang diuji, satu klon (Lokal Sidondo) tidak mampu menghasilkan amplifikasi fragmen DNA. Hal tersebut menunjukkan ketiga primer yang digunakan tidak sesuai/kompatibel dalam mendeteksi variasi klon Lokal Sidondo. Hal ini menunjukkan bahwa klon Lokal Sidondo memiliki hubungan kekerabatan yang jauh dengan klon lainnya.

Klon Lokal sidondo dan Palolo merupakan klon yang dibudidayakan masyarakat lokal sejak lama dan tidak diketahui asalnya. Klon lokal telah beradaptasi lama dilapangan dan menunjukkan adaptasi yang lebih baik. Walaupun sama-sama klon lokal namun menunjukkan variasi genetik yang berbeda. Lokal Sidondo tidak dapat diamplifikasi dengan menggunakan ketiga primer, namun sebaliknya untuk klon Lokal Palolo. Walaupun kedua klon tersebut memiliki penampakan sama, dimana warna kulit buah bila masak berwarna kuning, namun secara genetik berbeda, seperti ditunjukkan dengan uji RAPD ini.

Klon Sulawesi 1 dan Sulawesi 2 tidak bisa dibedakan dengan menggunakan

tiga primer tersebut. Hasil amplifikasi menunjukkan pola pita yang sama, sehingga menunjukkan kekerabatan yang dekat. Perbedaan genotip tersebut diikuti oleh perbedaan fenotip kedua klon. Secara morfologi klon-klon tersebut memiliki kemiripan pada warna kulit buah ketika masak yaitu kemerahan.

Data penelitian juga menunjukkan variasi genetik yang tinggi pada klon ICCRI 1 Palolo dan ICCRI 1 Sidondo. Klon ICCRI 1 yang diperoleh dari dua lokasi yang berbeda tersebut menunjukkan karakter genotip yang berbeda pula. Hal tersebut ditunjukkan dari pola pita yang berbeda yang dimiliki dari hasil amplifikasi pada masing-masing primer. Namun lain halnya klon ICCRI 3 Palolo dan ICCRI 3 Sidondo, terdapat dua primer yang dapat membedakannya yaitu TCH05 dan TCM20 (Gambar 1 dan Gambar 2).

Sampel DNA kakao klon Sulawesi 1, Sulawesi 2, M01 dan Lokal Palolo yang diamplifikasi dengan menggunakan primer TCM20 menunjukkan adanya 3 pita spesifik pada ukuran 2450, 1800 dan 800 bp, yang hanya dimiliki oleh klon M01 (Gambar 3.). Khususnya untuk klon ICCRI 1 Palolo dan ICCRI 3 Sidondo, juga dapat dibedakan secara genetik dengan menggunakan primer TCM20.

Untuk klon ICCRI 1 Palolo dan ICCRI 1 Sidondo, dapat dibedakan secara

genetik dengan menggunakan ketiga primer. Lain halnya dengan klon ICCRI 3 Palolo dan ICCRI 3 Sidondo yang hanya dapat dibedakan dengan menggunakan primer TCH05. Hal tersebut dikarenakan terdapat 2 pita spesifik yang hanya dimiliki oleh klon ICCRI 3 sidondo yaitu pada ukuran 2500 dan 1375 bp (Tabel 1).

Hasil penelitian ini menunjukkan ketiga primer yaitu TCH05, AS9870 dan TCM20 dapat digunakan dalam mendeteksi variasi genetik setiap klon, kecuali klon Sulawesi 1 dan Sulawesi 2. Untuk membedakan klon Sulawesi 1 dan Sulawesi 2 perlu digunakan primer atau metode lain.

IV. UCAPAN TERIMAKASIH

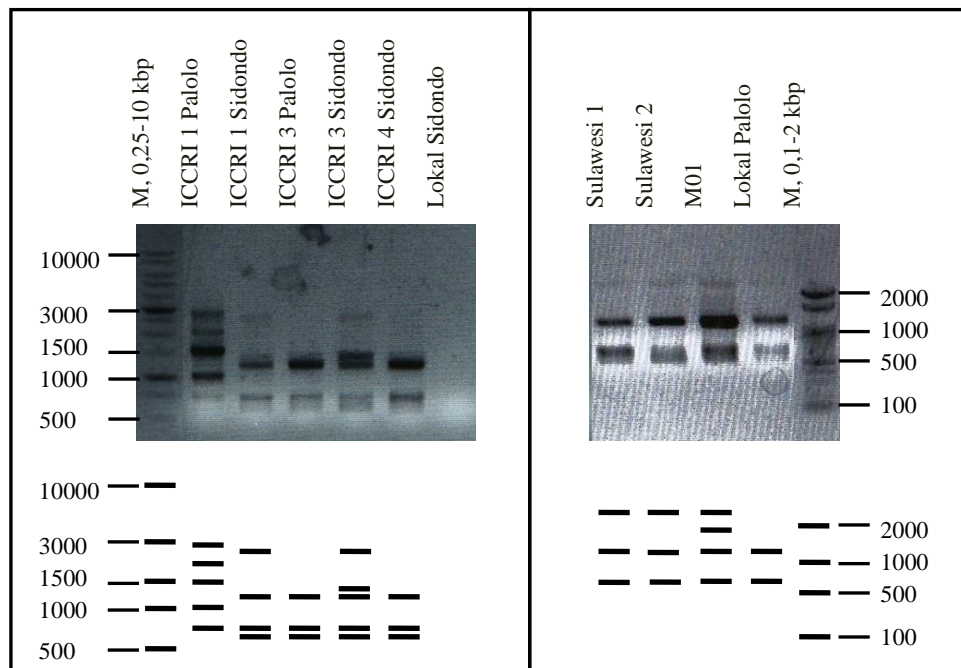
Ucapan terima kasih kepada *Bilateral Exchange Program JSPS (Japan Society for the Promotion of Science) - DGHE (Directorate General of Higher Education) Joint Research Project 2013-2014*, yang telah mendanai penelitian ini melalui kerjasama dengan Pusat Studi Bioteknologi Universitas Tadulako. Ucapan yang sama disampaikan kepada Prof. Takashi Shiina dan Ms. Yoko Ishizaki (*Kyoto Prefectural University*) atas bantuan yang diberikan selama penelitian dan Ibu Sami Bukang S.P (Laboran Lab. Bioteknologi FMIPA UNTAD) atas bantuannya selama ini.

Polimorfisme Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dari Perkebunan Rakyat Kabupaten Sigi
(Rifka dkk)

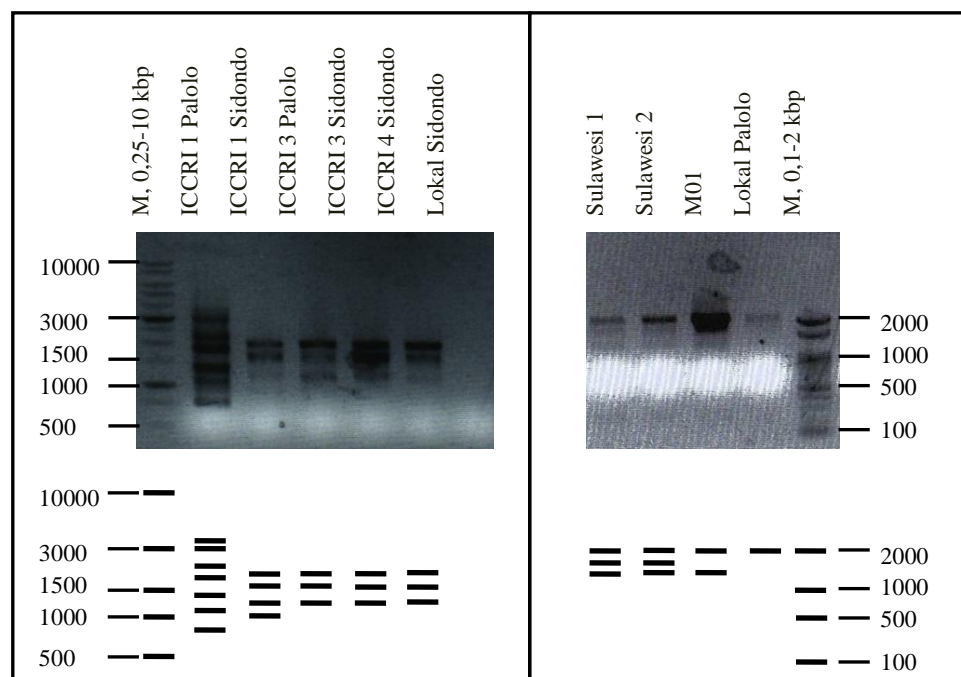
V. DAFTAR PUSTAKA

- Aragon, E., Rivera, C., Korpelainen, H., Rojas, A., Elomaa, P., Valkonen, J. P.T., 2012. Genetic diversity of native cultivated cacao accessions (*Theobroma cacao* L.) in Nicaragua. *Plant Genetic Resources*, 10(3), pp.254-257.
- Argout, X., Salse, J., Marc Aury, J., Guiltinan, M.J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2), pp.101-108.
- Engels, J., Bartley, B.G.D., dan Enriquez, C.G.A., 1980. Cacao descriptors, their states and modus operandi. Turrialba, Costa Rica. *CATIE. Tech Bull* 7:196
- Figueira, A., Janick, J., dan Goldsbrough, P., 1992. Genome Size and DNA Polymorphism in *Theobroma cacao*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 117(4), pp.673-677.
- Figueira, A., Janick, J., Levy, M., Goldsbrough, P., 1994. Reexamining the Classification of *Theobromacacao* L. Using Molecular Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 119(5), pp.1073-1082.
- Goran, J.A.K.N., Laurent, V., Risterucci, A.M., Lanaud, C., 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobromacacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, 73(1994), pp.589-597.
- Gusmiaty, Restu, M. dan Pongtuluran, I., 2012. Seleksi Primer untuk Analisis Keragaman Genetik Jenis Biti (*Vitex coffassus*). *Perennial*, 8(1), pp.25-29.
- Kuhn, D.N., Ronning, C.M., dan Schnell, R.J., 1995. Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 120(4), pp.681-686.
- Lea, J., 2004. Extraction of DNA From Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Malaysian Cocoa Journal*, 1, pp.19-23.
- Motamayor, J.C., Lachenaud, P., da Silva E Mota, J.W., Llor, R., Kuhn, D.N.,

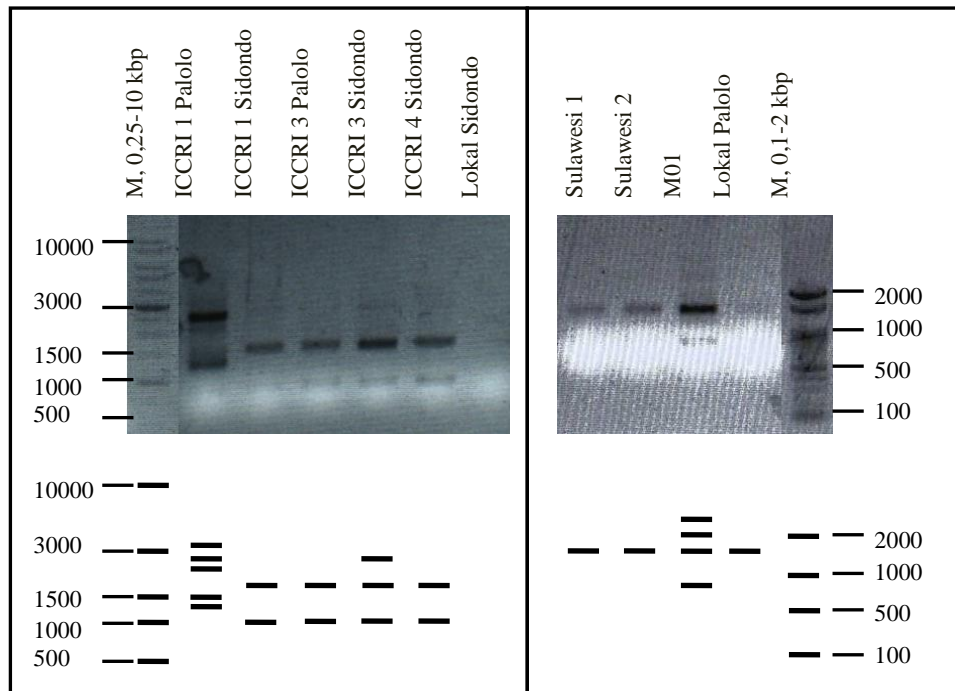
- Brown, J.S., dan Schnell, R.J., 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao*L.). *PloSone*, 3(10), p.e3311.
- Prana, T.K. dan Hartati, N.S., 2003. Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L. Schott) Indonesia dengan Teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) : Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia*, 5(2), pp.107–112.
- Risterucci, A.M., Grivet, L., Goran, J.A.K.N., Pieretti, I., Flament, M.H., Lanaud, C., 2000. A high-density linkage map of *Theobromacacao* L. *Theor Appl Genet*, 101, pp.948-955.
- Santos, R.C., Pires, L., Correa, R.X., 2012. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet Resour Crop Evol*, 59, pp.327-345.
- Sereno, M.L., Albuquerque, P.S.B., Vencovsky, R., Figueira, A., 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 7, pp.13-24.
- Trognitz, B., Scheldeman, X., Hansel-hohl, K., Kuant, A., Grebe, H., Hermann, M., 2011. Genetic Population Structure of Cacao Plantings within a Young Production Area in Nicaragua. *PloS one*, 6(1).



Gambar 1. Pita DNA hasil amplifikasi delapan genom kakao melalui analisis RAPD menggunakan primer TCH05.



Gambar 2. Pita DNA hasil amplifikasi delapan genom kakao melalui analisis RAPD menggunakan primer AS9870.



Gambar 3. Pita DNA hasil amplifikasi delapan genom kakao melalui analisis RAPD menggunakan primer TCM20.

Tabel 1. Hasil skoring pita DNA.

TCH05	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	AS9870	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	TCM20	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
3500 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3500 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3500 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
3250 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3250 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3250 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
3000 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3000 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	3000 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
2750 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2750 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2750 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
2600 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	2600 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2600 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
2500 bp	0	1	0	1	0	-	0	0	0	0	2500 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2500 bp	1	0	0	1	0	-	0	0	0	0
2450 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2450 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2450 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0
2300 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2300 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	2300 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
2250 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2250 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	2250 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
2000 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	1	0	2000 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	2000 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1800 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1800 bp	1	0	0	0	0	-	1	1	0	0	1800 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0
1750 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1750 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1750 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0
1600 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1600 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	1600 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1500 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1500 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1500 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1400 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	1400 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	1400 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1
1375 bp	0	0	0	1	0	-	0	0	0	0	1375 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1375 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1250 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	1250 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	1250 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1125 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1125 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1125 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
1000 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1000 bp	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	1000 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0
800 bp	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	800 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	800 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0
750 bp	1	1	1	1	1	-	0	0	0	0	750 bp	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	750 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
650 bp	0	1	1	1	1	-	0	0	0	0	650 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	650 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
200 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	200 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	200 bp	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0

Keterangan: Diberi skor 1 jika terdapat pita dan 0 jika tidak terdapat pita pada ukuran berat molekul yang sama untuk masing-masing primer. A (ICCRI 1 Palolo); B (ICCRI 1 Sidondo); C (ICCRI 3 Palolo); D (ICCRI 3 Sidondo); E (ICCRI 4 Sidondo); F (Lokal Sidondo); G (Sulawesi 1); H (Sulawesi 2); I (M01) dan J (Lokal Palolo).

Tabel 2. Urutan basa nukleotida primer RAPD, jumlah dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi.

Primer	Sekuens	Ukuran pita (bp)	Jumlah pita	Jumlah pita polimorfik	Polimorfik (%)
TCH05	AGTCGTCCCC	650 - 2750	12	12	100
AS9870	TTCCCCGCCC	750 - 3500	13	13	100
TCM20	AGGTCTTGGG	1000 - 3250	11	11	100
Total			36	36	100