

Sidik Jari DNA Plasma Nutfah Mangga Berdasarkan Analisis Fragmen Marka SSR (*Simple Sequence Repeat*) Berlabel

Dwinita W. Utami^{1*}, Tri J. Santoso¹, dan N. Hidayatun¹

Diterima 25 November 2011/Disetujui 1 Maret 2012

ABSTRACT

DNA fingerprinting technology can be used for understanding the diversity of germplasm. The purpose of this preliminary study was to analyze the genetic diversity based on DNA fingerprints of mango germplasm using 15 fluorescent-labeled SSR markers. Nineteen Mango accessions from KP Cukurgondang collection, Pasuruan, East Java and 15 SSR markers for mangoes were used in this study. Development of multiplex sets of M13-labeled primer used in the analysis aimed at improving the effectiveness and efficiency of molecular marker technology in mango DNA fingerprint analysis. The analysis of genetic diversity of 19 accessions of mango germplasm using 15 SSR markers resulted in 7 groups where four groups separated from the other three. Each of the four groups consisted of one accession, while the three other groups consisted of some accessions. The results may represent the diversity of shape and color of fruit characters. However, further study is needed to get specific marker for each mango accession.

Key word : DNA fingerprint, Mango, fluorescent SSR labeled.

ABSTRAK

Teknologi sidik jari DNA dapat digunakan untuk memahami keanekaragaman suatu plasma nutfah. Tujuan dari penelitian awal ini adalah menganalisis keragaman genetik berdasarkan sidikjari DNA plasma nutfah mangga menggunakan 15 marka SSR yang berlabel *fluorescent*. Sembilan belas aksesori plasma nutfah mangga dari koleksi KP Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur dan 15 marka SSR untuk mangga digunakan dalam penelitian ini. Pengembangan set multiplex primer berlabel M13 digunakan dalam analisis bertujuan untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi teknologi marka molekuler dalam analisis sidikjari DNA mangga. Analisis keragaman genetik 19 aksesori plasma nutfah mangga menggunakan 15 marka SSR dapat menghasilkan 7 kelompok yang terdiri atas 4 kelompok yang masing-masing beranggotakan satu aksesori dan 3 kelompok lainnya yang terdiri atas beberapa aksesori. Hasil pengelompokan dapat mewakili keragaman karakter bentuk dan warna buah. Namun demikian perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk mendapatkan penciri spesifik masing-masing aksesori plasma nutfah mangga.

Kata kunci : Sidikjari DNA, mangga, SSR berlabel fluorescent

PENDAHULUAN

Mangga (*Mangifera indica* L.) berasal dari daerah sekitar Bombay dan daerah sekitar kaki gunung Himalaya, kemudian dari daerah tersebut menyebar ke luar daerah, diantaranya ada yang sampai di Amerika Latin, terutama Brasilia, sebagian ke benua Afrika, juga negeri di kawasan Asia Tenggara, seperti Vietnam, kepulauan Philipina dan Indonesia (Viruel *et al.*, 2005). Keluarga mangga (*Anacardiaceae*) ini mempunyai banyak genus dan spesies (jenis). Genus *Mangifera* mempunyai 62 spesies, namun yang menghasilkan buah yang enak ada 16 spesies. Mangga yang umum dikonsumsi

termasuk species *Mangifera indica* L. Menurut Pracaya (2006), mangga memiliki keragaman tinggi, yang berbeda-beda dalam beberapa karakter seperti : ukuran buah, warna kulit buah, warna daging buah, rasa, aroma, bentuk pohon dan daun. Setiap negara memiliki varietas mangga yang khas misalnya *Alphonso* di India, *Carabao* di Filipina, *Kensington* di Australia, *Sindhryna* di Pakistan dan Indonesia dengan varietas-varietas unggulnya seperti Simanalagi, Golek, Arumanis, Madu, Gedong, Indramayu dan Kepyor (Rismunandar, 1983). Menurut Pracaya (2006) masih ada beberapa varietas mangga selain yang disebutkan di atas seperti Kweni, Lalijiwa, Endong dan Pakel. Mangga

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111. Email : dnitawu@windowslive.com *penulis korespondensi

sekerabat dengan bacang (*M. foetida*), kemang (*M. kemanga*), kuweni (*M. odorata*), kasturi dan lain-lain.

Secara konvensional, karakter morfologi telah dipakai secara rutin untuk identifikasi varietas. Namun demikian pada umumnya karakter morfologi dikontrol oleh banyak gen dan dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pengaruh lingkungan, interaksi epistatis, efek pleiotropik dan lainnya sehingga diperlukan teknologi alternatif. Salah satu teknologi alternatif yang dikembangkan adalah identifikasi keragaman genetik berdasarkan analisis sidik jari DNA (*DNA fingerprinting*). Analisis sidik jari DNA adalah salah satu metode aplikasi marka molekuler untuk deteksi filogenetik dalam memahami keanekaragaman suatu plasma nutfah melalui rekonstruksi hubungan kekerabatan (*phylogentic relationship*) (Hershkovitz dan Leipe, 1988).

Analisis sidik jari DNA pada plasma nutfah mangga telah banyak dikembangkan berdasarkan beberapa jenis marka DNA, seperti marka *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dan marka *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) (Schnell *et al.*, 1995; Bally *et al.*, 1996; Lopez-valenzuela *et al.*, 1997; Ravishanikar *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2006; Fitmawati *et al.*, 2010). Beberapa kelemahan masih ditemukan yaitu bahwa penggunaan marka RAPD ini memiliki keterbatasan dalam akurasi deteksi karena hasilnya tidak mudah untuk direproduksi kembali (Honscho *et al.*, 2005). Marka lain yang telah banyak diaplikasikan pada plasma nutfah mangga adalah marka *simple sequence repeat* (SSR) (Eiadthong *et al.*, 1999; Schnell *et al.*, 2005; Honscho *et al.*, 2005; Duval *et al.*, 2005; Singh dan Bhat, 2008; Singh *et al.*, 2006; Viruel *et al.*, 2006). Perkembangan terkini dari penggunaan marka SSR ini adalah pembacaan ukuran alel SSR secara semi-otomatik menggunakan primer berlabel fluoresens menggunakan alat *genetic analyzer* (Jain *et al.*, 2004). Sebelumnya, Schuelke (2000) memodifikasi sistem deteksi ini dengan meletakkan label fluoresens pada primer ketiga, yaitu primer universal M-13, dalam amplifikasi PCR untuk menekan biaya analisis. Tujuan dari penelitian awal ini adalah menganalisis sidik jari DNA plasma nutfah mangga berdasarkan ukuran alel spesifik menggunakan marka SSR berlabel fluorescent.

BAHAN DAN METODE

Materi genetik

Sembilan belas aksesori plasma nutfah Mangga koleksi KP Cukurgondang, Pasuruan, Jawa Timur, yang terdiri dari 17 aksesori termasuk dalam spesies *Mangifera indica*, 1 spesies *Mangifera gedebi* dan 1 spesies *Mangifera odorata*. Tiga aksesori merupakan aksesori introduksi, yaitu Gayam (*Alphonso*) yang berasal dari India dan Haden217 yang berasal dari Colombia, sedangkan aksesori lokal KP Cukurgondang dikoleksi dari beberapa lokasi di Jawa Timur, Jawa Barat dan Kalimantan Selatan. Secara fenotipe ke-19 aksesori yang digunakan dalam penelitian telah dikarakterisasi memiliki variasi dalam bentuk buah dan warna buah (Tabel 1).

Sebanyak 15 marka *Simple Sequence Repeat* (SSR) yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA plasma nutfah mangga dan marka M13 sebagai label fluorescent ditampilkan pada Tabel 2.

Persiapan sampel

Daun mangga yang masih muda dipilih dan digunakan untuk sampel ekstraksi DNA. Sebanyak 1-2 g dari daun muda tersebut dipersiapkan dari masing-masing sampel untuk diekstraksi sehingga akan mendapatkan sampel DNA yang cukup untuk digunakan dalam proses PCR.

Isolasi DNA dan analisis PCR

Daun muda mangga diekstraksi DNA-nya secara miniprep menggunakan prosedur ekstraksi DNA dari Chaudhry *et al.* (1999) dengan modifikasi. Daun digerus sampai halus dengan mortar menggunakan bantuan nitrogen cair. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL dan ditambahkan dengan 1 mL buffer ekstraksi dingin (0.35 M Glukosa; 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0); 0.005 M Na₂-EDTA (pH 8.0); 2% PVP; 0.1% (w/v) asam ascorbat acid dan 0.2% (w/v) 2-mercaptoethanol). Serbuk daun yang telah ditambah dengan buffer ekstraksi kemudian dicampur sampai homogen dan diinkubasi pada es selama 5-10 menit. Campuran disentrifugasi pada 12,000 rpm selama 8 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan endapan yang terbentuk ditambahkan dengan 500 µL buffer lisis (2% CTAB, 2% PVP, 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0), 0.005 M Na₂-EDTA (pH 8.0), 0,56 M NaCl). Untuk mempermudah proses lisis, maka

campuran divorteks dan diinkubasi pada 65°C selama 30 menit (pada setiap 10 menit, campuran dibolak-balik). Campuran ditambahkan dengan chloroform:isoamilalkohol (chisam) dengan perbandingan 24:1 sebanyak 500 μ L dan dibolak-balik agar tercampur merata, kemudian disentrifugasi pada 12,000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke tabung mikro 1.5 mL yang baru. Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan natrium asetat 3M sebanyak 50 μ L dan isopropanol dingin sebanyak 500 μ L ke dalam supernatan dan dicampur secara perlahan-lahan. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 12,000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA yang terbentuk

dicuci dengan 200 μ L etanol 70%. Campuran disentrifugasi kembali selama 3 menit pada kecepatan 12,000 rpm. Pelet DNA selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 10 menit. Pelet DNA yang telah kering dilarutkan dalam 50 μ L buffer TE yang mengandung 1 μ L RNase (20 mg/L) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. DNA kemudian dipurifikasi kembali dengan penambahan Natrium Asetat 3M dan dipresipitasi dengan etanol absolut serta dicuci kembali dengan etanol 70%. Pelet DNA dilarutkan kembali dengan akuades steril dan siap digunakan untuk proses PCR.

Tabel 1. Plasma nutfah mangga yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA

No.	Plasma nutfah	Asal	Spesies	Bentuk dan warna buah
1.	Golek31	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Oval panjang, warna buah masak kuning-oranye
2.	Arumanis143	Probolinggo (Jatim)	<i>M. indica</i>	Oval panjang, warna buah masak kuning-oranye
3.	Manalagi69	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Oval panjang, warna buah masak kuning-oranye
4.	Jenisbaru	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat-panjang, warna buah masak kuning
5.	Paw-paw	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah masak kuning
6.	Duren	Cirebon (Jabar)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah masak kuning-oranye
7.	Gayam (Alphonso)	Introduksi	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah masak kuning
8.	Haden 217	Introduksi	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah masak merah
9.	Sala250	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Lonjong-panjang, warna buah masak kuning
10.	Li'ar	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah masak kuning-oranye
11.	Dodolbirowo	Pohjentrek (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat-oval, warna buah masak kuning
12.	Kalapahar	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat-kecil, warna buah masak kuning
13.	Gedong	Cirebon (Jabar)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah kuning-oranye
14.	Kenlayung (Kensington apple)	Introduksi	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah kuning-oranye
15.	Dugur141	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah kuning
16.	Rengganis129	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat, warna buah kuning
17.	Mangga durhaka	Kal-Sel	<i>M. gedebi</i>	Bulat, warna buah masak kuning
18.	Kweni	Cirebon (Jabar)	<i>M. Odorata</i>	Bulat, warna buah masak kuning
19.	Manggasari (Sophia43)	Pasuruan (Jatim)	<i>M. indica</i>	Bulat-oval, warna buah masak kuning

Tabel 2. Marka SSR yang digunakan (Schnell *et al.*, 2005; Duval *et al.*, 2005)

No	Lokus	GeneBank/ EMBLAccess	Sekuen Primer (5'-3')	Motif repeat
1.	MiSHRS-1	AY942817	F: TAACAGCTTTGCTTGCTCC R:TCCGCCGATAAACATCAGAC	(CT/AG) ₁₄
2.	MiSHRS-18	AY942819	F: AAACGAGGAAACAGAGCAC R: CAAGTACCTGCTGCAACTAG	(AAC/GTT) ₈
3.	MiSHRS-26	AY942821	F: TGTAGTCTCTGTTTGCTTC R:TCTGTGTCGTCAAACTC	(GTT/AAC) ₆
4.	MiSHRS-30	AY942823	F: AGAGAATAAAGGGGACACCAGAC R:CCATCATCGCCCACTCAG	(GTTGTGT/ACACAAC) ₃
5.	MiSHRS-39	AY942829	F: GAACGAGAAATCGGGAAC R:GCAGCCATTGAATACAGAG	(GTT/AAC) ₈
6.	MiSHRS-23	AY942820	F: AGGCTTTTATCTTCGGCCC R:AAACGAAAAAGCAGCCCA	(TATG/CATA) ₇
7.	MiSHRS-33	AY942825	F: CGAGGAAGAGGAAGATTATGAC R:CGAATACCATCCAGCAAATAC	(CGG/CCT) ₇
8.	MiSHRS-37	AY942828	F: CTCGCATTTCTCGCAGTC R:TCCCTCCATTAAACCCTCC	(AG/CT) ₉
9.	mMiCR003	AJ635165	F: GATGAAACCAAAGAAGTCA R:CCAATAAGAACTCCAACC	(TG) ₁₀
10.	mMiCR010	AJ635172	F: TAGGGATATAGCTGGAGG R:ACGCAGTAGAACCTGTG	(TG) ₁₃
11.	MiSHRS-32	AY942824	F: TTGATGCAACTTTCTGCC R:ATGTGATTGTTAGAATGAACTT	(CA/TG) ₉
12.	MiSHRS-36	AY942827	F: GTTTTCATTCTCAAAATGTGTG R:CTTTCATGTTTCATAGATGCAA	(CT/AG) ₁₅
13.	mMiCR-36	AJ938181	F: ACCACGAAAAAGACAACCTC R:TATCTTTGTAAATAGGTTAAT	(TG) ₁₁
14.	mMiCR014	AJ635176	F: GAGGAACATAAAGATGGTG R:GACAAGATAAACAACCTGGAA	(TG) ₁₁
15.	mMiCR003	AJ635165	F: GATGAAACCAAAGAAGTCA R:CCAATAAGAACTCCAACC	
	M13, black WellRed		TGT AAA ACG GCC AGT	
	M13, green WellRed		TGT AAA ACG GCC AGT	
	M13, blue WellRed		TGT AAA ACG GCC AGT	

Analisis PCR sampel DNA mangga dilakukan menggunakan mesin PCR MJ Research PCT100 (MJ Research Inc. USA). Total campuran reaksi untuk PCR adalah 20 uL yang terdiri atas 2 µL buffer PCR 10x, 1.2 µL MgCl₂ 25 mM, 0.4 µL dNTP mix 10 mM, 0.6 µL primer Forward (10 uM), 1.0 uL primer Reverse (10 uM), 1.0 uL primer M13 berlabel (10 uM), 0.16 µL Faststart *Taq DNA polymerase* (5 unit/ µL) (Roche), 2 µL DNA (50 ng/µL), dan MQ H₂O. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan program sebagai berikut: denaturasi awal 94 °C selama 3 menit, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 50 °C selama 1 menit, dan pemanjangan/sintesis DNA pada suhu 72 °C selama 2 menit. Tahapan program PCR tersebut diulang sebanyak 35 siklus. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Setelah proses PCR selesai, sampel disimpan pada suhu 4 °C atau bisa langsung divisualisasi dengan elektroforesis gel.

Visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis gel dilakukan pada 1% gel agarosa dengan 1x bufer TAE (Tris-Acetic acid-EDTA). Sebanyak 5 µl produk PCR dari masing-masing sampel ditambahkan dengan 2 µl *loading dye* dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur di dalam gel. Untuk menentukan ukuran dari produk PCR disertakan juga DNA standar 1 Kb ladder plus (Invitrogen) sebagai pembanding. Sampel DNA tersebut dielektroforesis dengan tegangan 80 V selama kurang lebih 1.5 jam. Setelah itu, agarosa gel diwarnai pada larutan etidium bromida (10 mg L⁻¹) selama 10 menit dan dicuci dengan air selama 20-30 menit. Agarosa gel kemudian divisualisasi dengan *Chemidoc gel system* (Biorad).

Analisis fragmen DNA secara multiplexing dengan mesin CEQ8000

Fragmen mikrosatelit dideteksi pada mesin *genetic analyzer* (Beckman Coulter® CEQ-8000). Produk

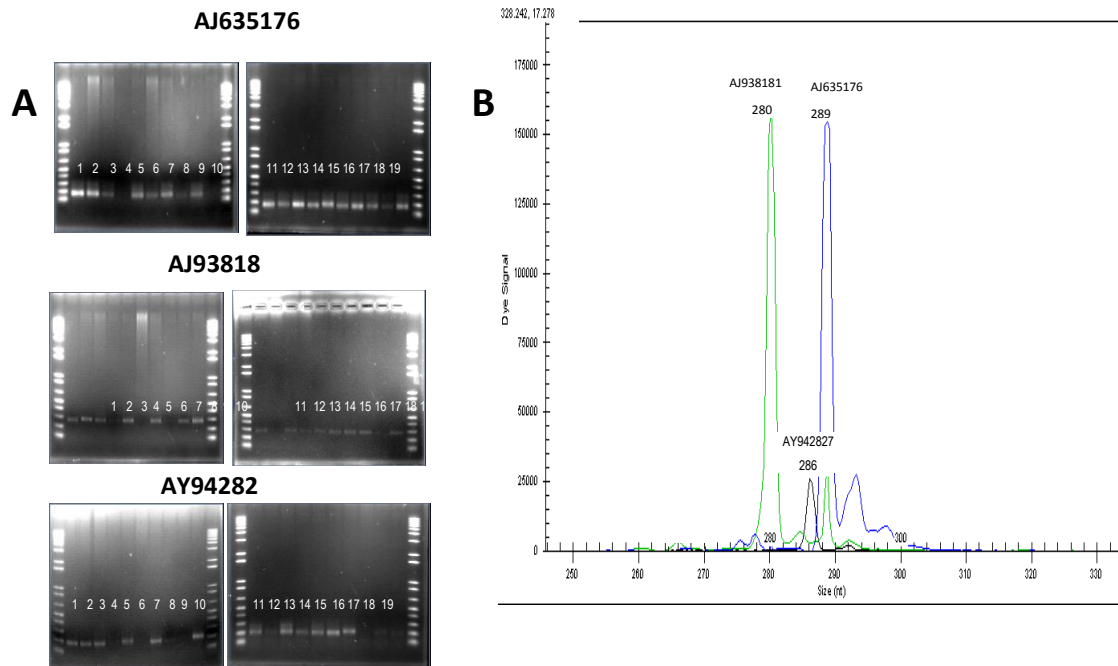
PCR dari setiap primer diencerkan dalam *sample loading solution* (SLS, Beckman Coulter®) kemudian dicampur dengan produk PCR dari beberapa primer lainnya (*multiloading*). Analisis data (calling allele dan binning dengan CEQ fragment Analysis Software dan analisis pengelompokan dengan program Tassel V2.1)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis sidik jari DNA plasma nutfah mangga dilakukan berdasarkan analisis penggandaan fragmen DNA dengan mesin PCR dan analisis fragmen ukuran hasil penggandaan fragmen DNA tersebut dengan mesin Genetic Analyzer CEQ8000. Melalui analisis fragmen DNA ini dapat diperoleh ukuran alel secara kuantitatif sebagai penciri genetik dari plasma nutfah mangga yang dianalisis. Beberapa hasil analisis penggandaan fragmen DNA pada 19 aksesi mangga menggunakan beberapa primer, antara lain : AJ635176, AJ938181 dan AY942827 beserta kuantifikasinya menggunakan

mesin Genetic Analyzer CEQ8000 seperti ditampilkan pada Gambar 1.

Pada Gambar 1 tersebut tampak bahwa menggunakan primer AJ635176 (yang berlabel biru) diperoleh hasil amplifikasi yang berukuran kurang lebih 200 pasang basa. Variasi ukuran hasil amplifikasi kurang terlihat pada pemisahan di gel agarose ini, sehingga tampak bersifat monomorfis. Beberapa variasi ukuran terlihat pada sampel nomor 3, yaitu plasma nutfah Manalagi69 pada marka AJ635176; sampel nomor 2, yaitu plasma nutfah Arumanis143 pada marka AJ938181; dan sampel nomor 13, yaitu plasma nutfah Gedong pada marka AJ942827. Namun demikian variasi ukuran yang diperoleh pada pemisahan gel agarose ini kurang dapat membaca perbedaan alel secara kuantitatif antara satu aksesi plasma nutfah mangga dengan aksesi plasma nutfah mangga yang lain. Untuk itu maka dilakukan analisis kuantifikasi ukuran alel dengan pendekatan analisis fragmen menggunakan mesin Genetic Analyzer CEQ8000, yang salah satu hasilnya seperti pada Gambar 1 (B).



Gambar 1. Beberapa hasil penentuan sidikjari DNA plasma nutfah mangga secara kualitatif dan

- A. Beberapa hasil amplifikasi PCR 19 aksesi plasma nutfah mangga secara kualitatif menggunakan marka AJ535176, AJ938181 dan AY942817 pada pemisahan di gel agarose. Keterangan nomor dapat dilihat pada Tabel 1.
- B. Salah satu hasil kuantifikasi ukuran hasil amplifikasi DNA menggunakan mesin Genetic Analyzer CEQ8000, sebagai sidikjari DNA dari salah satu aksesi plasma nutfah mangga. Manggasari menggunakan primer berlabel fluorescent : AJ938181 (warna hijau), AY942827 (warna hitam) dan AJ635176 (warna biru).

Penentuan sidikjari DNA plasma nutfah mangga secara kuantitatif menggunakan mesin *Genetic Analyzer* CEQ 8000 (Gambar 1B) menunjukkan bahwa salah satu plasma nutfah mangga, yaitu Manggasari memiliki ukuran alel secara kuantitatif pada lokus AJ938181 (berlabel fluorescen warna hijau) sebesar 280 nukleotida. Sedangkan pada lokus AY942827 dan AJ635176 yang berlabel fluorescen warna hitam dan biru memiliki ukuran alel berturut-turut sebesar 286 dan 289 nukleotida. Ukuran alel kuantitatif inilah sebagai penciri sidik jari DNA dari plasma nutfah mangga Manggasari.

Analisis keragaman genetik plasma nutfah Mangga

Berdasarkan ukuran kuantitatif hasil penggandaan fragmen DNA sebagai penciri genetik plasma nutfah mangga yang telah diperoleh, selanjutnya dilakukan analisis keragaman genetik 19 aksesi plasma nutfah Mangga . Secara kuantitatif jumlah dan kisaran ukuran alel dari setiap lokus 15 marka yang digunakan dalam analisis seperti ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah dan kisaran kuantitatif ukuran alel pada 15 marka SSR

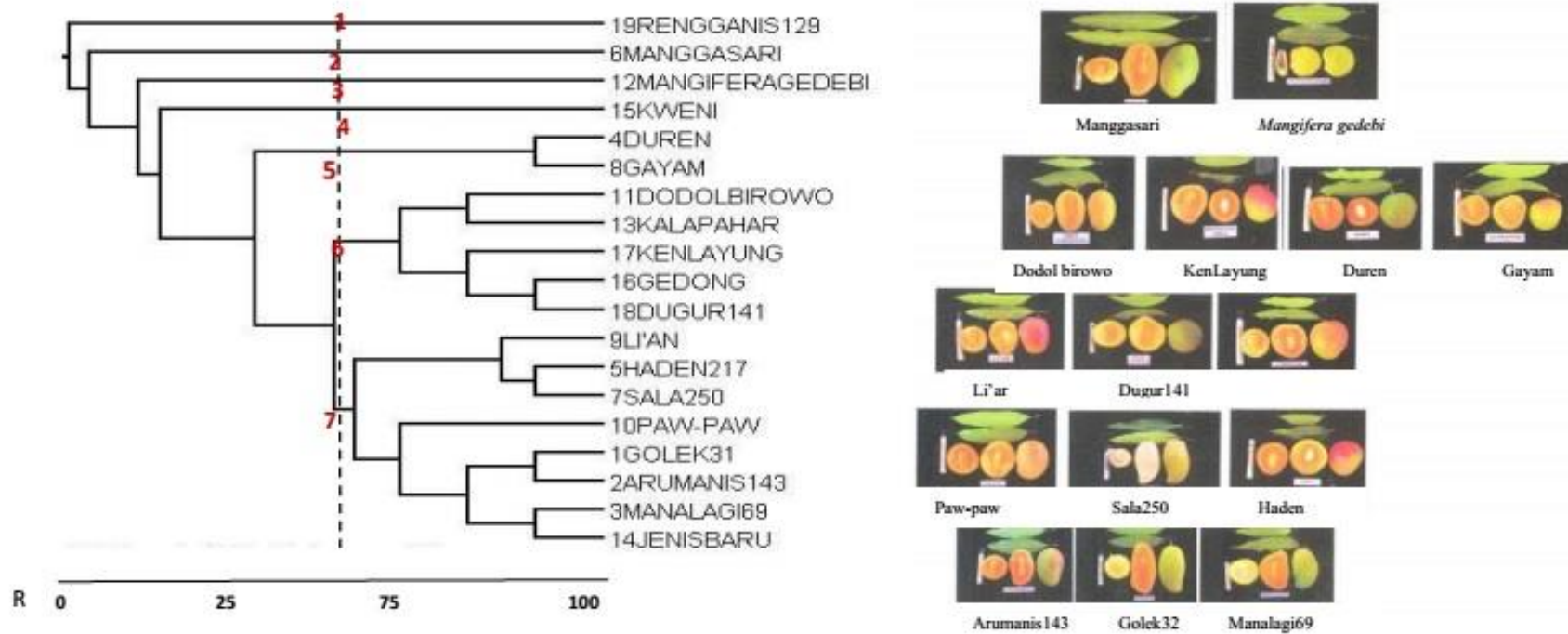
No	Lokus	GeneBank/ EMBLAccess	Jumlah alel	Warna label	Ukuran alel (pb)
1.	MiSHRS-1	AY942817	2	D2 (Hitam)	191-207
2.	MiSHRS-18	AY942819	3	D2 (Hitam)	90-111
3.	MiSHRS-26	AY942821	2	D3 (Hijau)	260-275
4.	MiSHRS-29	AY942822	2	D4 (Biru)	174-182
5.	MiSHRS-30	AY942823	2	D2 (Hitam)	220-222
6.	MiSHRS-39	AY942829	3	D3 (Hijau)	348-369
7.	MiSHRS-23	AY942820	3	D2 (Hitam)	199-203
8.	MiSHRS-33	AY942825	3	D4 (Biru)	236-248
9.	MiSHRS-37	AY942828	2	D4 (Biru)	127-132
10.	mMiCR003	AJ635165	3	D3 (Hijau)	310-318
11.	mMiCR010	AJ635172	4	D2 (Hitam)	270-290
12.	MiSHRS-32	AY942824	5	D4 (Biru)	200-224
13.	MiSHRS-36	AY942827	4	D2 (Hitam)	190-286
14.	mMiCR-36	AJ938181	2	D3 (Hijau)	252-281
15.	mMiCR014	AJ635176	2	D4 (Biru)	249-289

Hasil analisis keragaman alel pada Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa lokus yang ditandai oleh marka AY942824 memiliki jumlah alel terbanyak, yaitu sebanyak 5 alel yang terdeteksi dengan kisaran ukuran antara 200 sampai dengan 224. Jumlah alel minimum yang terdeteksi pada beberapa marka adalah sebanyak 2 alel. Sedangkan kisaran ukuran paling sempit terdeteksi pada lokus AY942823, yaitu pada kisaran antara 220 sampai dengan 222.

Dari data ukuran alel secara kuantitatif di atas, keragaman genetik dari 19 aksesi plasma nutfah mangga dapat ditampilkan dalam bentuk dendrogram dan dendrogram tersebut dapat dibandingkan dengan pengelompokan secara fenotipe seperti terlihat pada Gambar 2. Hasil

dendrogram pada Gambar 2 (A) menunjukkan bahwa dari 19 aksesi plasma nutfah yang dianalisis mengelompok dalam 7 cabang yang tersusun atas 4 cabang yang terpisah dengan 3 cabang yang lain dan dari 4 cabang tersebut masing-masing cabang terdiri dari satu aksesi, sedangkan 3 cabang yang lain merupakan cabang utama yang terdiri atas beberapa plasma nutfah. Secara fenotipik, aksesi-aksesi plasma nutfah pada satu kelompok cabang di atas memiliki karakter fenotipe yang berbeda dengan aksesi-aksesi pada kelompok yang lain. Sebagai contohnya adalah seperti pada aksesi-aksesi:

1. *Mangifera gedebi* adalah aksesi yang berasal dan berkembang di lahan rawa di Kalimantan Selatan. Pada umumnya plasma nutfah mangga yang



Gambar 2. A. Dendrogram keragaman genetik 19 plasma nutfah mangga berdasarkan ukuran kuantitatif sidik jari DNA menggunakan 15 marka SSR. Terdapat 7 kelompok aksesori plasma nutfah mangga pada tingkat kesamaan (*similarity level*) 65%.

B. Karakter morfologi beberapa aksesori plasma nutfah sesuai dengan pengelompokan sidik jari DNA.

berkembang di Kalimantan bersifat spesifik lokal setempat. Beberapa mangga populer seperti Harumanis, Golek dan Manalagi kurang berkembang di Kalimantan karena iklim dan kondisi lingkungan yang tidak sesuai. Kebanyakan lahan di Kalimantan didominasi oleh lahan kering masam, beriklim basah dengan pH 4.5-5.5. (Djufri dan Djumberi 2005). Pada umumnya daging buah plasma nutfah mangga asal Kalimantan ini memiliki daging buah tipis dan berserat kasar (Krismawati, 2008).

2. Kweni adalah aksesori plasma nutfah mangga yang termasuk spesies *Mangifera odorata*. Aksesori plasma nutfah ini memiliki karakter buah yang berwarna kuning dengan tekstur yang lebih berserat berbeda dengan jenis mangga yang lain.

3. Rengganis adalah aksesori plasma nutfah mangga yang termasuk *Mangifera indica* dengan ciri spesifik memiliki ukuran buah ekstrim kecil yang sangat berbeda dengan ukuran buah aksesori lain yang termasuk *Mangifera indica*.

4. Manggasari atau Sophia 243 adalah aksesori plasma nutfah mangga yang termasuk *Mangifera indica* yang telah dilepas dengan karakter spesifik memiliki kandungan tepung buah tinggi berbeda dibanding aksesori mangga lain yang termasuk spesies *M. indica*.

Cabang yang lain merupakan cabang utama dimana terdiri atas sebagian besar aksesori mangga yang dianalisis. Cabang utama ini tersusun atas aksesori-aksesori unggul yang terseleksi berdasarkan karakter kimiawi dan morfologi. Cabang utama ini terdiri dari 3 kelompok, yaitu : kelompok 1, merupakan kelompok aksesori plasma nutfah mangga yang memiliki aroma tajam; kelompok 2 dan 3, sebagian besar merupakan kelompok aksesori plasma nutfah yang dilepas sebagai buah segar atau buah meja. Pada umumnya aksesori-aksesori yang termasuk kelompok ini memiliki karakter kimiawi dan morfologi yang spesifik, seperti warna kulit dan rasa yang segar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Analisis keragaman genetik 19 aksesori plasma nutfah mangga menggunakan 15 marka SSR menunjukkan pengelompokan dalam 7 cabang yang tersusun atas 4 cabang merupakan cabang terpisah dimana masing-masing cabang terdiri dari satu aksesori, 3 cabang yang lainnya merupakan cabang utama yang terdiri atas beberapa plasma nutfah. Hasil pengelompokan di atas dapat mewakili keragaman karakter

bentuk dan warna buah. Namun demikian perlu dilakukan analisis sidik jari DNA lebih lanjut menggunakan marka molekuler dan aksesori plasma nutfah yang lebih banyak, untuk mendapatkan ukuran alel sebagai penciri spesifik masing-masing aksesori plasma nutfah mangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad I., A.U. Malik, S.A. Malik, N. Tabassam, M. Rahman, Y. Zafar. 2006. Application of DNA fingerprinting technology to estimate genetic divergence among mango cultivars genotype. *Acta Horticulturae* 773: 440-440
- Bally I.S.E., G.C. Graham, R.J. Henry. 1996. Genetic diversity of Kensington mango in Australia. *Australian J. Exp. Agric.* 36:243-247.
- Chaudhry B., A. Yasmeen, T. Husnain, S. Riazuddin. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17:1-17
- Djufri, F., A. Djumberi. 2005. Penggalan data pendukung domestikasi dan komersialisasi jenis, spesies dan varietas tanaman buah di Kalimantan Selatan, Lokakarya Domestikasi dan Komersialisasi Tanaman hortikultura. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, Jakarta. Hlm 35-48.
- Duval M.F., J. Bunel, C. Sitbon, M. Risterucci. 2005. Development of microsatellite markers for mango. *Mol. Ecol. Notes* 5:824-826.
- Eiadthong W., K. Yonemori, A. Sigiura, N. Utsonomiya, S. Subhadrabandhu. 1999. Identification mango cultivars of Thailand and evaluation their genetic variation by SSR anchored primer. *Scientia Horticultura* 82:57-66.
- Fitmawati, A. Hartana, B.S. Purwoko. 2010. Diversity of Indonesian Mango (*Mangifera indica*) cultivars based on morphological and RAPD markers. *SABRAO J. Breed. Genet.* 42:84-95.

- HersHKovitz M.A., D.D. Leipe, 1988. Phylogenetic analysis. In Baxevanis AD and BF Oullette (Eds.) Bioinformatics a Practical Guide to the Analysis of Genes and Protein. Jhon Wiley and Sons, New York.
- Honsho C., K. Nishiyama, W. Eiadthong, K. Yonemori. 2005. Isolation and characterization of new microsatellite markers in mango. Mol. Ecol. Notes 5:152-154.
- Jain, S., R.K. Jain, S.R. McCouch. 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 965-977.
- Krismawati A. 2008. Eksplorasi dan Karakterisasi buah spesies kerabat Mangga Kalimantan Tengah. Buletin Plasma Nutfah 14: 76-80.
- Lopez-valenzuela J.A., O. Martinez, O. Paredes-Lopez. 1997. Geographic differentiation and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. Hort sci. 32:1105-1108.
- Pracaya. 2007. Bertanam Mangga (Edisi Revisi). Penebar Swadaya. Bogor. 144.
- Ravishankar K.V., L. Anand, M.R. Dinesh. 2000. Assessment of genetic relatedness among mango cultivars of India using RAPD markers. J. Hort. Sci. Biotechnol. 75:198-201.
- Rismunandar. 1983. Bertanam Mangga. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Singh S, Karihaloo J, Gaikwad A (2007). DNA Fingerprinting of some mango (*Mangifera indica* L.) cultivars using anchored-ISSR markers. J. Plant. Biochem. Biot. 16: 113-117
- Singh, Bhat, 2008. Molecular characterization and analysis of geographical differentiation of Indian mango germplasms. International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT 2008
- Schnell R.J., C.T. Olano, W.E. Quintanilla, A.W. Meerow. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellites loci from mango and cross-species amplification in closely related taxa. J. Molecular Ecological Notes 5:625-627.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. Nature Biotechnol. 18: 233-234.
- Viruel M.A., P. Escribano, M. Barbieri, M. Ferri, J.I. Hormanza. 2005. Fingerprinting, embryo type and geographic differentiation in mango with microsatellites. Molecular Breeding, *Mol. Breed.* 15: 383-3.