

Keragaman Genetik Genotipe Mutan Cabai (*Capsicum annuum* L.) Hasil Iradiasi Sinar Gamma Berdasarkan Penanda Mikrosatelit

Genetic Diversity of Chilipepper (*Capsicum annuum* L.) Mutant Genotypes from Gamma Irradiation Treatment Based on Microsatellite Markers

Kristianto Nugroho^{1,2)}, Trikoesoemaningtyas³⁾, Muhamad Syukur³⁾, Puji Lestari^{4*)}

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga Bogor 16680, Indonesia

²Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong Science Center, Jalan Raya Jakarta-Bogor, Cibinong, Kabupaten Bogor 16915

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

⁴Organisasi Riset Pertanian dan Pangan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong Science Center, Jalan Raya Jakarta-Bogor, Cibinong, Kabupaten Bogor 16915

*Penulis untuk korespondensi E-mail: plestari129@yahoo.com

Diajukan: 19 Januari 2020 **/Diterima:** 19 April 2022 **/Dipublikasi:** 25 Mei 2022

ABSTRACT

Genetic diversity analysis of mutant genotypes is important to show how many genetic changes that occurred from the original variety. Microsatellite is one of molecular marker that could be used to analyze the genetic diversity in mutant genotypes because of its abundance in plant genome, high reproducibility, high polymorphisms, and codominant. The aims of this study was to analyze genetic diversity of chili mutant genotypes treated by gamma irradiation using microsatellite markers and to collect polymorphism informations from those markers. This study was conducted from November 2020 to February 2021 in ICABIOGRAD Molecular Biology Laboratory in Bogor. As many as ten mutant genotypes from M2 generation conducted by gamma irradiation from Lingga variety that showed morphological changes in fruit size were analyzed using 27 microsatellite markers. Phylogenetic tree construction and genetic similarity matrix were analyzed using NTSYS 2.1 and the polymorphisms of the markers were analyzed using PowerMarker 3.25. The phylogenetic analysis showed that the mutant genotypes were separated from Lingga variety in different cluster with coefficient of similarity 0.57. There are three mutant genotypes with the lowest genetic similarity to Lingga such as L275, L312, and L352 and there is only one mutant genotype with the highest genetic similarity to Lingga namely L106. The polymorphism level analysis showed that there were six microsatellite markers having high informativeness ($PIC > 0.7$) that could be used to analyze genetic diversity of mutants and as marker selected tools in the next generation.

Keywords: microsatellite; molecular marker; phylogenetic; similarity; polymorphism

INTISARI

Analisis keragaman genetik mutan perlu dilakukan untuk melihat sejauh mana perubahan genetik yang terjadi dibanding varietas asalnya. Mikrosatelit merupakan penanda molekuler yang dapat dimanfaatkan dalam analisis keragaman genetik mutan karena keberadaannya yang melimpah dalam genom tanaman, reproduktibilitas tinggi, polimorfisme tinggi, dan bersifat kodominan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk

menganalisis keragaman genetik genotipe mutan cabai hasil iradiasi sinar gamma menggunakan penanda mikrosatelit serta memperoleh informasi tingkat polimorfisme dari penanda mikrosatelit yang digunakan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2020 hingga Februari 2021 di Laboratorium Biologi Molekuler BB Biogen Bogor. Sebanyak sepuluh genotipe mutan cabai hasil iradiasi varietas Lingga generasi M2 yang menunjukkan perubahan pada ukuran buah dianalisis keragamannya menggunakan 27 penanda mikrosatelit. Konstruksi pohon filogenetik dan matriks kesamaan genetik dibuat menggunakan perangkat lunak NTSYS versi 2.1 sedangkan analisis polimorfisme marka dilakukan menggunakan PowerMarker 3.25. Analisis filogenetik menunjukkan adanya pemisahan antara varietas Lingga dan genotipe mutan menjadi dua kluster pada koefisien kemiripan genetik 0,57. Dari kesepuluh genotipe mutan yang dianalisis terdapat tiga genotipe mutan dengan kemiripan genetik terendah dari varietas Lingga yaitu L275, L312, dan L352 dan satu genotipe dengan kemiripan genetik paling tinggi dengan varietas Lingga yaitu L106. Analisis tingkat polimorfisme menunjukkan bahwa terdapat enam penanda mikrosatelit dengan tingkat informativitas tinggi ($PIC > 0,7$) yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik mutan maupun sebagai alat bantu seleksi pada generasi selanjutnya.

Kata kunci: filogenetik; kemiripan; mikrosatelit; marka molekuler; polimorfisme

PENDAHULUAN

Induksi mutasi merupakan salah satu teknik yang memiliki peran penting dalam meningkatkan keragaman genetik tanaman pertanian khususnya sebagai modal dasar untuk kegiatan seleksi dalam proses pemuliaan tanaman (Maesaroh *et al.*, 2014). Di sisi lain, teknik induksi mutasi memiliki kelemahan yaitu perubahan genetik yang dihasilkan bersifat acak sehingga perlu dilakukan upaya untuk mengetahui sejauh mana tingkat perubahan genetik yang terjadi melalui kegiatan analisis keragaman genetik (Asadi, 2013). Analisis keragaman genetik mutan dapat dilakukan baik melalui pendekatan morfologi maupun molekuler.

Analisis keragaman genetik menggunakan penanda morfologi memiliki kelebihan lebih murah dari segi biaya serta lebih mudah dalam pengaplikasian, namun penanda morfologi memiliki sejumlah kelemahan antara lain bersifat inkonsisten

karena adanya pengaruh dari faktor lingkungan khususnya pada karakter kuantitatif, memakan waktu yang lama karena harus menunggu tanaman hingga berproduksi, bersifat destruktif untuk pengamatan morfologi bagian tertentu seperti buah atau umbi, dan tidak mampu mendeteksi perbedaan pada genotipe-genotipe dengan kemiripan genetik yang tinggi (Sari *et al.*, 2017). Sementara itu analisis keragaman genetik secara molekuler membutuhkan biaya yang lebih besar namun tingkat akurasi dan presisinya lebih tinggi karena dapat mengidentifikasi perubahan genetik yang terjadi hingga pada tingkat gennya (Husain *et al.*, 2016). Selain itu data hasil analisis molekuler dapat bersifat melengkapi data yang diperoleh dari hasil analisis morfologi. Salah satu penanda molekuler yang banyak diaplikasikan dalam kegiatan analisis keragaman genetik

tanaman yaitu mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeat* (SSR).

Mikrosatelit merupakan sekuen berulang secara tandem 1-5 pasang basa yang keberadaannya melimpah pada genom organisme eukariotik (Vieira *et al.*, 2016). Kelebihan penanda mikrosatelit yaitu bersifat kodominan, polimorfisme tinggi, reproduksibilitas tinggi, serta keberadaannya melimpah pada genom tanaman (Abuzayed *et al.*, 2017). Penanda ini telah banyak diaplikasikan dalam kegiatan analisis keragaman genetik tanaman, pembuatan sidik jari DNA tanaman, manajemen plasma nutfah, studi evolusi, pemetaan genetik, dan analisis *quantitative trait loci* (QTL) (Chen *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Thakur *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Di Indonesia sendiri, kegiatan analisis keragaman genetik mutan cabai menggunakan penanda mikrosatelit telah banyak dilakukan pada penelitian sebelumnya antara lain pada penelitian Dwinianti *et al.* (2019), Juliandari *et al.* (2019), Manzila *et al.* (2020), dan Rahmattullah *et al.* (2020), namun mutan yang digunakan berasal dari penggunaan mutagen kimia berupa senyawa *ethyl methanesulfonate* (EMS). Analisis keragaman mutan cabai hasil iradiasi sinar gamma menggunakan penanda molekuler mikrosatelit belum banyak dilakukan dan baru terbatas pada penggunaan penanda RAPD seperti yang dilakukan pada penelitian Rosmaina *et al.* (2020). Pada penelitian ini, sebanyak sepuluh genotipe mutan cabai generasi kedua (M2) hasil iradiasi varietas

Lingga menggunakan sinar gamma pada dosis 450 Gy dianalisis keragaman genetiknya menggunakan penanda mikrosatelit. Kesepuluh genotipe mutan cabai tersebut telah dianalisis karakter morfologinya pada penelitian sebelumnya dan menunjukkan adanya perubahan pada rata-rata panjang dan diameter buah dibanding varietas asalnya (Nugroho *et al.*, 2021). Penanda mikrosatelit digunakan karena tingkat polimorfisme dan reproduksibilitasnya yang tinggi serta keberadaannya yang melimpah dalam genom tanaman sehingga diharapkan mampu membedakan antara genotipe mutan dan varietas asalnya serta mengonfirmasi bahwa perubahan morfologi yang terjadi memang disebabkan oleh pengaruh mutasi dan bukan karena pengaruh dari faktor lingkungan.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menganalisis keragaman genetik genotipe mutan cabai terpilih hasil iradiasi sinar gamma menggunakan penanda mikrosatelit serta memperoleh informasi tingkat polimorfisme dari penanda mikrosatelit yang digunakan.

BAHAN DAN METODE

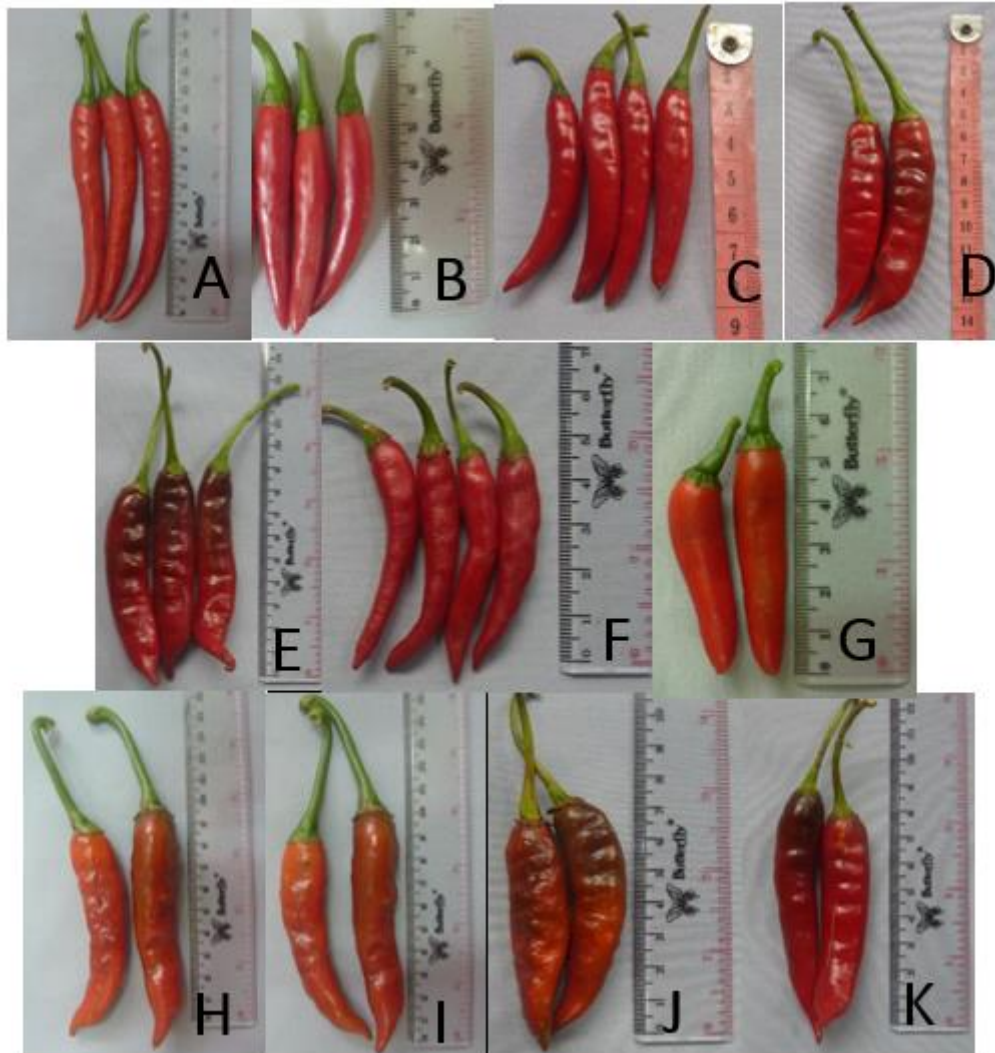
Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Cimanggu Bogor pada bulan November 2020 hingga Februari 2021.

Materi Genetik

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini berupa sepuluh genotipe mutan cabai generasi kedua (M2) hasil iradiasi varietas Lingga menggunakan sinar gamma pada dosis 450 Gy. Kesepuluh genotipe tanaman mutan tersebut teridentifikasi

mengalami perubahan morfologi pada ukuran buahnya (Gambar 1). Bagian tanaman yang digunakan untuk kegiatan analisis molekuler pada penelitian ini berupa bagian daun yang berada pada posisi ketiga atau keempat dari pucuk.



Gambar 1. Sepuluh genotipe mutan cabai yang digunakan pada penelitian ini. Keterangan: A: Lingga (varietas asal), B: L9, C: L11, D: L87, E: L106, F: L111, G: L269, H: L275, I: L298, J: L312, K: L352

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi menggunakan metode (Doyle and Doyle, 1990) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan melalui penambahan senyawa PVP (*polyvinylpyrrolidone*), natrium bisulfit, dan β -

merkptoetanol yang berfungsi untuk menghambat aktivitas senyawa fenolik dan polisakarida. Sebanyak 0,5 gram potongan daun cabai digerus dengan bantuan *blue pestle* menggunakan 300 μ l bufer ekstraksi

(100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 2% (w/v) CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*), 2% (w/v) PVP (*polyvinylpyrrolidone*), dan 0,38% (w/v) natrium bisulfit), diikuti dengan penambahan kembali bufer ekstraksi hingga volumenya mencapai 800 µl. Selanjutnya dilakukan penambahan senyawa β-merkaptotanol sebanyak 2 µl per sampel diikuti inkubasi pada suhu 65 °C selama 15 menit. Sampel dibolak-balik setiap 5 menit agar homogen. Sampel kemudian diekstrak menggunakan 800 µl larutan kloroform: isoamil alkohol (24:1), diikuti proses sentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit pada suhu 20 °C. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan ke dalam tabung mikro baru.

Selanjutnya dilakukan penambahan 3M natrium asetat pH 5,2 sebanyak 1/10 kali volume supernatan dan diikuti dengan penambahan isopropanol dingin sebanyak satu kali volume supernatan. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu -20 °C selama satu jam. Setelah itu, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu 20 °C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet DNA yang terbentuk dicuci menggunakan larutan 70% etanol sebanyak 500 µl. Pelet kemudian dikeringanginkan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol. Pelet yang telah kering dilarutkan dalam 100 µl larutan TE (10 mM Tris pH 8,0 dan 1 mM EDTA) yang telah ditambahkan enzim RNase A (10 mg/ml). Selanjutnya larutan DNA stok

diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam lalu disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

Amplifikasi DNA dan Elektroforesis

Setiap sampel diamplifikasi pada total reaksi 10 µl mengandung 10 ng/µl DNA *template* sebanyak 2 µl; 2x MyTaq HS (Bioline, UK) sebanyak 5 µl; primer *Forward* dan *Reverse* dengan konsentrasi 10 µM masing-masing sebanyak 0,5 µl, dan ddH₂O steril. Amplifikasi dilakukan menggunakan 27 pasang primer mikrosatelit cabai yang berasal dari beberapa referensi (Tabel 1). Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR *T1 Thermocycler* (Biometra, Germany) dengan profil PCR sebagai berikut: denaturasi awal dilakukan pada suhu 95 °C selama 5 menit, diikuti oleh sebanyak 35 siklus proses denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, *annealing* (tahap penempelan primer) pada suhu 52-55 °C selama 1 menit, dan *extension* (perpanjangan basa) pada suhu 72 °C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan siklus *final extension* (tahap akhir perpanjangan basa) pada suhu 60 °C selama 15 menit. Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel poliakrilamid 6% pada tangki berisi bufer 1x TBE (*Tris Borate EDTA*) pada tegangan 90 V selama 100 menit. Hasil elektroforesis selanjutnya diwarnai dengan larutan 10 mg/ml *ethidium bromida* dan divisualisasi di bawah sinar UV menggunakan alat *UV Transilluminator* (Biorad, USA).

Tabel 1. Daftar primer mikrosatelit cabai yang digunakan pada penelitian ini

Penanda mikrosatelit	Motif	Sekuens (5' – 3')	Referensi
CAN130829	(TTTG) ₂ (TTG) ₁₀	F: GGATGCGGAAGATGAAGACGA R: CAACAACAGCAACAACAATCAAA	Lee <i>et al.</i> (2004)
HPMS1-62	(TG) ₂₃ (AG) ₉	F: CATGAGGTCTCGCATGATTTAC R: GGAGAAGGACCATGTACTGCAGAG	Lee <i>et al.</i> (2004)
HPMS1-173	(GA) ₁₆ (TG) ₂	F: TGCTGGGAAAGATCTCAAAGG R: ATCAAGGAAGCAAACCAATGC	Lee <i>et al.</i> (2004)
HPMS2-21	(AT) ₁₁ (AC) ₉ (ATAC) ₁₀	F: TTTTCAATTGATGCATGACCGATA R: CATGTCATTTTGTATTGATTTGG	Lee <i>et al.</i> (2004)
HPMS1-148	(GA) ₁₄	F:GGCGGAGAAGAAGACTAGACGATTAGC R: CCACCCAATCCACATAGACG	Lee <i>et al.</i> (2004)
AFF244121	(TTG) ₅ IMP	F: TACCTCCTCGCCAATCCTTCTG R: TTGAAAGTTCTTTCCATGACAACC	Lee <i>et al.</i> (2004)
CAMS234	(AT) ₆ IMP(GT) ₃ IMP (TA) ₅ (TG) ₆ CG (TG) ₇	F: TATAGCCCATGGGTGCCTTT R:AAAACCCAATATTAACCATATGCAA	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
CAMS051	(GT) ₃ A(TA) ₄ ... (TG) ₁₀	F: ACCCAGTTCCCTTTCTTGGT R: GAAGGTTAGCGGAATGAACG	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
CAMS163	(AT) ₇ (GT) ₁₄	F: TCCATATAGCCCGTGTGTGA R: GCGTGGGAATACAATGCTAGA	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
CAMS420	(TC) ₅ CA(TC) ₄	F: CAGCGTTCTATCGTCTCAAATG R: TTGACAAACCAGAAATTGATCG	Minamiyama <i>et al.</i> (2006)
CAMS390	(AG) ₁₉	F: CTGTTCTCCTCCCTCCCTCT R: TGAAGCAAGAACTGAACAATCA	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS011	(CA) ₃ (AC) ₁₁ A(TA) ₃	F: GGGTTATCAAATGGCCGATA R: ATTCCCTTTCCAGCATTTA	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS134	(AC) ₁₈	F: ATATGGTTCGGCTTCGTTCT R: CATCAATTTGGGGCATCTCT	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS612	(TAA) ₁₆	F: TCCACCATGAATCGAAGACA R:AGTCGCATCCTGTCCAAAGT	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS839	(TCT) ₁₆	F: GCAAGCACATCATGCTGAAT R: CGAGCGCATTATTGAAGTGA	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS211	(TG) ₇	F: CGTGGGTGCCTTCTTATGTT R: ATCGTCCGGACATGGTTAGT	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS319	(TC) ₂₀	F: TCACCTTCCACAGCATCAAG R: CAAACGCAAACACCAATCAG	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
CAMS362	(TC) ₉	F: CCCCTTCTGACCTTGATTGA R: TATGCCCTCCTGTGATAGC	Minamiyama <i>et al.</i> (2007)
EPMS404	(CTT) ₁₂	F: TCTCTCTACATCTCTCCGTTG R: TGTGTTGCTTCTTGGACGAC	Nagy <i>et al.</i> (2007)
GPMS29	(GT) ₁₅ GGT ₇ (GTT) ₂	F: CAGGCAATACGGGACATC R: TGTGTTGCTTCTTGGACGAC	Nagy <i>et al.</i> (2007)
GPMS197	(GA) ₃ (TAT) ₁₆	F: GCAGAGAAAATAAAATTCTCGG/ R: CAATGGAAATTTTCATCGACG	Nagy <i>et al.</i> (2007)
EPMS441	(AG) ₁₁	F: GCACGAGGAAAGAGAGACATAG R: TCAACGGATTTCAGTCTTCCC	Nagy <i>et al.</i> (2007)
GPMS112	(AT) ₈ (GT) ₁₉	F: TCCCTCAGCAGCAACAATTT R: GTCGGGCTCTTTGATTGTGT	Nagy <i>et al.</i> (2007)
GPMS194	(TA) ₁₇ (GA) ₁₂	F: AGGTGGCAGTTGAGGCTAAG R: GTTCTAGGTCTTTGCCCTGG	Nagy <i>et al.</i> (2007)
CAMS396	(AG) ₁₂	F: GTCGGCCGTCATTCATCTATT R: AGCTTGATGCACCTGGTCTT	Mimura <i>et al.</i> (2012)
CAeMS138	(AG) ₅ ...(AG) ₅ ... (GA) ₃ ...(AG) ₃	F: ACACACACAATTTCCCTCACTCAC R: GTTTCTCTCAAATCCCTCCGTTGTTT	Mimura <i>et al.</i> (2012)
CaSSR246	-	F:CCTGAGTGGTAATGTGGAAA R:AAAGTGTGGTATGGGT	Manzila <i>et al.</i> (2020)

Analisis Data

Hasil visualisasi gel poliakrilamid selanjutnya diskor sebagai data biner. Setiap pita hasil amplifikasi yang tervisualisasi dianggap sebagai satu alel. Pita-pita yang memiliki laju pergerakan yang sama dianggap sebagai lokus yang sama. Setiap pita yang terlihat diberi skor 1, pita yang tidak terlihat diberi skor 0, dan sampel yang tidak menghasilkan ampikon diberi skor 9 dan dianggap sebagai data yang hilang. Kegiatan skoring dibantu dengan perangkat lunak Gel Analyzer (Lazar, 2010) untuk mempermudah penentuan ukuran pita ampikon.

Data hasil skoring kemudian dianalisis menggunakan program *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic-Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested* (UPGMA-SAHN) pada perangkat lunak NTSYS versi 2.1 (Rohlf, 2000). Matriks kesamaan genetik antar individu mutan dihitung berdasarkan koefisien *Simple Matching* (SM) menggunakan subprogram *SIMQUAL*. Sementara itu untuk mengetahui nilai frekuensi alel utama, diversitas gen, PIC (*Polymorphic Information Content*), dan heterozigositas yang dihasilkan oleh penanda mikrosatelit, digunakan perangkat lunak PowerMarker versi 3.25 (Liu and Muse, 2005). Nilai PIC dihitung berdasarkan rumus (Lee *et al.*, 2004):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

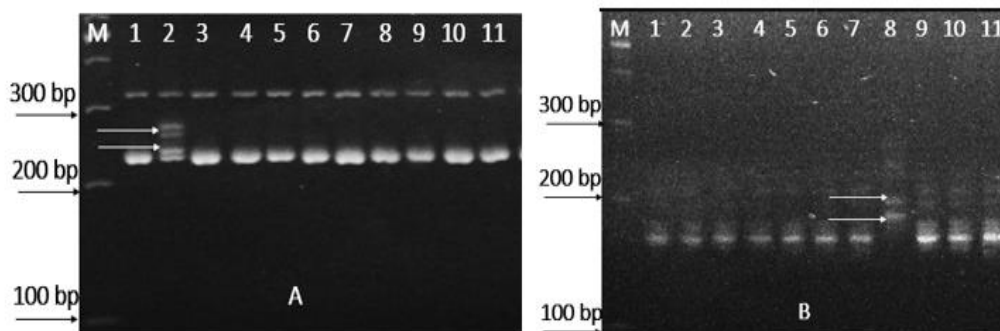
di mana PIC merupakan nilai *Polymorphic Information Content* penanda mikrosatelit, P_i merupakan frekuensi alel ke- i , dan k adalah jumlah total alel yang berbeda pada satu lokus.

Nilai PIC yang dijadikan standar untuk mengevaluasi penanda mikrosatelit yang digunakan dibedakan menjadi tiga kategori menurut Hildebrand *et al.* (1992), yaitu PIC $>0,7$ untuk penanda yang informativitasnya tinggi, $0,5 < PIC < 0,7$ untuk penanda yang informativitasnya sedang, dan PIC $<0,5$ untuk penanda dengan tingkat informativitas rendah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi Alel Pada Genotipe Mutan Cabai

Hasil analisis molekuler menggunakan penanda mikrosatelit menunjukkan adanya variasi alel pada genotipe mutan cabai yang dianalisis (Gambar 2). Variasi tersebut terlihat dari perbedaan ukuran alel dibanding varietas Lingga. Menurut Girija and Dhanavel (2015), mutasi pada suatu gen dapat menjadi sumber pembentukan alel baru dan mampu menyebabkan terjadinya variasi pada suatu organisme. Variasi genetik yang muncul pada suatu organisme dapat menjadi sumber daya potensial bagi para pemulia untuk kegiatan perakitan varietas unggul baru (Lestari, 2016).



Gambar 2. Hasil elektroforesis sampel PCR sepuluh genotipe mutan cabai pada gel poliakrilamid 6% menggunakan penanda: (A) CAMS396, (B) GPMS197

Secara keseluruhan persentase perubahan alel yang terjadi pada genotipe mutan cabai yang digunakan pada penelitian ini berkisar dari 44,44 hingga 70,37%. dengan rata-rata sebesar 59,99% (Tabel 2). Persentase perubahan alel paling tinggi ditemukan pada genotipe L352 yang menunjukkan perubahan ukuran buah lebih besar dari Lingga. Adanya perubahan ukuran alel pada genotipe mutan cabai yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan kemampuan penanda mikrosatelit yang digunakan dalam mendeteksi terjadinya mutasi pada daerah

sekuens berulang. Menurut Sobir dan Syukur (2015), sekuens berulang menjadi penyusun dari 50-70% dari total DNA dalam genom inti dan keberadaannya tersebar dalam genom tanaman. Secara umum, keberadaan sekuens berulang jarang ditemukan di daerah tempat gen berada, karena laju mutasinya yang sangat tinggi mencapai antara 10^{-4} hingga 10^{-3} mutasi per lokus per generasi, sehingga dapat mempengaruhi ekspresi gen (Vieira *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2019).

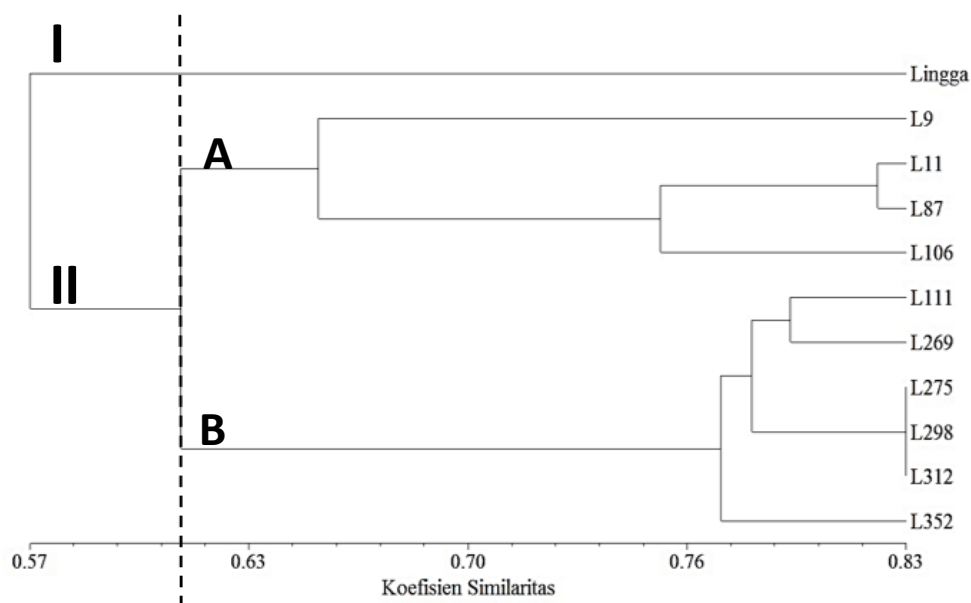
Tabel 2. Persentase perubahan alel antara genotipe mutan cabai dibanding Lingga

Genotipe	Persentase perubahan alel
L9	66,67
L11	66,67
L87	55,56
L106	44,44
L111	59,25
L269	51,85
L275	59,25
L298	59,25
L312	66,67
L352	70,37
Rerata	59,99

Analisis Filogenetik Genotipe Mutan Cabai

Analisis filogenetik menggunakan metode klustering dilakukan dengan cara mengelompokkan genotipe-genotipe yang dianalisis sehingga setiap genotipe yang memiliki kesamaan atau kemiripan paling tinggi dengan genotipe lain akan mengelompok pada klaster yang sama (Permatasari *et al.*, 2018). Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa kesepuluh genotipe mutan cabai yang digunakan pada

penelitian ini memisah dari Lingga pada koefisien kemiripan genetik 0,57 (Gambar 3). Varietas Lingga berada pada klaster pertama sedangkan kesepuluh genotipe mutan berada pada klaster kedua. Pada klaster kedua, genotipe mutan yang dianalisis pada penelitian ini kembali mengelompok menjadi dua subklaster yaitu subklaster IIA yang terdiri atas genotipe L9, L11, L87, dan L106 dan subklaster IIB yang terdiri atas genotipe L111, L269, L275, L312, dan L352 (Gambar 3).



Gambar 3. Pohon filogenetik yang menunjukkan pengelompokan sepuluh genotipe mutan cabai hasil iradiasi sinar gamma berdasarkan 27 penanda mikrosatelit menggunakan program UPGMA-SAHN

Di antara kesepuluh genotipe mutan yang dianalisis, terdapat satu genotipe dengan kemiripan genetik paling tinggi terhadap Lingga yaitu L106 dengan nilai similaritas sebesar 64% (Tabel 3). Sementara itu terdapat tiga genotipe mutan dengan nilai kemiripan genetik paling rendah terhadap Lingga yaitu L275, L312, dan L352 dengan nilai similaritas sebesar 52% (Tabel

3). Secara keseluruhan bila dibandingkan antara sesama genotipe mutan, dari sepuluh genotipe yang dianalisis terdapat tiga genotipe yang memiliki nilai kemiripan genetik paling tinggi yaitu pada genotipe L275, L298, dan L312 dengan nilai kesamaan genetik sebesar 83% (Tabel 3). Ketiga genotipe tersebut mengelompok pada subklaster yang sama yaitu subklaster IIB (Gambar 3). Selain itu terdapat pula genotipe

mutan dengan nilai kemiripan genetik terendah sebesar 52% yaitu antara genotipe L9 dengan L352. Adanya pemisahan antara genotipe mutan dengan varietas Lingga pada klaster yang berbeda serta rendahnya nilai kesamaan genetik yang diperoleh mengindikasikan bahwa dosis iradiasi sinar gamma yang diberikan mampu menginduksi terjadinya perubahan genetik pada genotipe mutan yang dihasilkan.

Tabel 3. Nilai matriks kesamaan genetik dari genotipe mutan cabai yang digunakan pada penelitian ini

Genotipe	Lingga	L9	L11	L87	L106	L111	L269	L275	L298	L312	L352
Lingga	1,00										
L9	0,61	1,00									
L11	0,54	0,64	1,00								
L87	0,59	0,68	0,81	1,00							
L106	0,64	0,66	0,74	0,78	1,00						
L111	0,57	0,59	0,68	0,73	0,69	1,00					
L269	0,59	0,59	0,66	0,69	0,66	0,80	1,00				
L275	0,52	0,54	0,57	0,62	0,61	0,76	0,80	1,00			
L298	0,59	0,57	0,59	0,69	0,66	0,81	0,80	0,83	1,00		
L312	0,52	0,54	0,56	0,57	0,61	0,74	0,80	0,83	0,83	1,00	
L352	0,52	0,52	0,59	0,59	0,59	0,74	0,78	0,78	0,81	0,76	1,00

Tabel 4. Ringkasan statistik polimorfisme penanda mikrosatelit cabai yang digunakan pada penelitian ini

Penanda mikrosatelit	Rentang ukuran alel (bp)	Jumlah alel	Frekuensi alel utama	Diversitas gen	Heterozigositas	PIC
CAN130829	222-236	4	0,55	0,63	0,00	0,58
CAMS390	163-167	2	0,91	0,16	0,00	0,15
CAMS234	139-178	4	0,50	0,54	1,00	0,44
CAMS051	148-161	4	0,50	0,65	0,91	0,59
CAMS396	217-230	3	0,77	0,37	0,18	0,33
CAeMS138	238-287	9	0,18	0,88	0,91	0,86
CaSSR246	217-242	4	0,41	0,67	1,00	0,61
EPMS404	237-269	6	0,23	0,82	1,00	0,79
GPMS29	248-255	2	0,91	0,17	0,00	0,15
GPMS197	193-259	6	0,27	0,80	1,00	0,77
HPMS1-148	272-305	3	0,50	0,54	1,00	0,44
AFF244121	186-237	4	0,36	0,70	1,00	0,64
CAMS011	134-145	6	0,27	0,81	1,00	0,78
CAMS134	220-224	2	0,82	0,30	0,00	0,25
CAMS163	237-253	4	0,45	0,58	1,00	0,49
CAMS211	210-257	7	0,50	0,70	1,00	0,67
CAMS319	194-217	4	0,50	0,54	1,00	0,44
CAMS362	226-238	4	0,45	0,64	0,00	0,58
CAMS420	197-224	4	0,77	0,37	0,09	0,33
CAMS612	170-206	3	0,50	0,60	1,00	0,52
CAMS839	151-153	2	0,73	0,43	0,00	0,39
EPMS441	132-140	2	0,64	0,46	0,00	0,36
GPMS112	253-280	5	0,45	0,67	1,00	0,61
GPMS194	248-276	5	0,36	0,76	1,00	0,72
HPMS1-62	255-295	10	0,18	0,87	1,00	0,85
HPMS1-173	160-197	5	0,45	0,69	1,00	0,64
HPMS2-21	292-299	2	0,55	0,50	0,00	0,37
Jumlah		116				
Rerata		4,30	0,51	0,59	0,63	0,53

Menurut Yulita *et al.* (2014), iradiasi sinar gamma pada dosis tertentu dapat menyebabkan kerusakan susunan DNA pada jaringan tanaman. Sinar gamma memiliki energi kinetik tinggi yang mampu membebani sel yang diradiasi sehingga mengubah reaksi kimia dalam sel tanaman yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya perubahan genetik (Sutapa dan Kasmawan, 2016). Efek mutagen sinar gamma dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti kadar air dan oksigen jaringan yang diradiasi, suhu saat iradiasi, besarnya dosis penyinaran yang diberikan,

Analisis Tingkat Polimorfisme Penanda Mikrosatelit yang Digunakan

Analisis polimorfisme menunjukkan sebanyak 116 alel mampu dideteksi menggunakan 27 penanda mikrosatelit dengan rata-rata 4,3 alel per marka dan kisaran 2-10 alel per lokus (Tabel 4). Jumlah alel yang berhasil dideteksi pada penelitian ini lebih banyak dibanding pada penelitian Manzila *et al.* (2020) yang berhasil mendeteksi 52 alel menggunakan sepuluh penanda mikrosatelit pada sepuluh genotipe mutan hasil induksi EMS. Jumlah alel yang berhasil dideteksi pada penelitian ini juga lebih banyak dari penelitian Terryana *et al.* (2020) yang berhasil mendeteksi 87 alel pada 20 varietas lokal cabai menggunakan 15 penanda mikrosatelit. Adanya perbedaan jumlah alel yang berhasil dideteksi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jumlah genotipe yang diuji serta jumlah dan karakteristik penanda mikrosatelit yang digunakan (Tasma dan Arumsari, 2013).

dan lamanya waktu penyinaran, serta faktor internal seperti siklus sel, volume kromosom saat interfase, dan genetik tanaman yang diradiasi (Spencer-Lopes *et al.*, 2018). Dosis iradiasi yang semakin tinggi serta waktu penyinaran yang lebih lama akan menyebabkan terjadinya kerusakan fisiologis yang semakin besar seperti kematian sel, terhambatnya pembelahan sel, melambatnya kecepatan pertumbuhan tanaman, penurunan kemampuan reproduksi tanaman, hingga sterilitas tanaman (Handini *et al.*, 2020).

Nilai frekuensi alel utama yang diperoleh pada penelitian ini berkisar dari 0,18 (HPMS1-62) hingga 0,91 (CAMS390 dan GPMS29) dengan rata-rata sebesar 0,51 (Tabel 4). Frekuensi alel utama, bersama dengan frekuensi alel minor merupakan nilai yang menjadi indikator keragaman genetik dan polimorfisme pada lokus yang diamati baik pada populasi liar maupun budidaya (Singh *et al.*, 2013). Menurut Pojskic (2018), perbedaan keduanya terletak pada lokus yang dianalisis, di mana frekuensi alel utama digunakan pada analisis lokus yang bersifat *Short Tandem Repeat* (STR) atau lokus yang terdiri atas sekuen berulang tandem sementara frekuensi alel minor digunakan pada analisis lokus *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) dan lokus bialelik lainnya. Parameter keragaman genetik lain yaitu diversitas gen juga menunjukkan nilai yang bervariasi dengan kisaran dari 0,16 (CAMS390) hingga 0,87 (HPMS1-62) dengan rata-rata sebesar 0,59 (Tabel 4). Nilai

heterozigositas yang merefleksikan kemampuan penanda mikrosatelit dalam mendeteksi alel-alel yang bersifat heterozigot, bervariasi dengan kisaran dari 0,09 hingga 1 dengan rata-rata sebesar 0,63. Pada penelitian ini terdapat delapan penanda mikrosatelit yang tidak mampu mendeteksi alel heterozigot pada sampel mutan yang digunakan yaitu CAN130829, CAMS390, GPMS29, CAMS134, CAMS362, CAMS839, EPMS441, dan HPMS2-21.

Nilai PIC yang menunjukkan tingkat polimorfisme dari penanda mikrosatelit yang digunakan pada penelitian ini berkisar dari 0,15 (CAMS390 dan GPMS29) hingga 0,85 (HPMS1-62). Berdasarkan kriteria Hildebrand *et al.* (1992), terdapat enam penanda mikrosatelit dengan tingkat informativitas tinggi yang memiliki nilai PIC >0,7. Sementara itu sisanya berada pada tingkat informativitas rendah hingga sedang seperti dirangkum pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengelompokan penanda mikrosatelit cabai berdasarkan nilai PIC pada penelitian ini

Penanda dengan tingkat informativitas tinggi (PIC >0,7)	Penanda dengan tingkat informativitas sedang (0,5 < PIC < 0,7)	Penanda dengan tingkat informativitas rendah (PIC < 0,5)
CaeMS138	CAN130829	CAMS234
EPMS404	CAMS051	CAMS396
GPMS197	CaSSR246	HPMS1-148
CAMS011	AFF244121	CAMS134
GPMS194	CAMS211	CAMS163
HPMS1-62	CAMS362	CAMS319
	CAMS612	CAMS420
	GPMS112	CAMS839
	HPMS1-173	EPMS441
		HPMS2-21
		CAMS390
		GPMS29

Keenam penanda mikrosatelit dengan tingkat informativitas tinggi tersebut dapat digunakan dalam kegiatan analisis keragaman genetik mutan maupun sebagai alat seleksi pada generasi selanjutnya.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diperoleh pada penelitian ini antara lain analisis keragaman genetik sepuluh genotipe mutan cabai terpilih generasi M2 hasil iradiasi sinar gamma menunjukkan pemisahan antara varietas Lingga dan genotipe mutan menjadi dua klaster pada koefisien kemiripan genetik 0,57. Sebanyak tiga dari sepuluh genotipe

mutan cabai yang dianalisis yaitu genotipe L275, L312, dan L352 menunjukkan tingkat kemiripan genetik terendah dari Lingga dan sebanyak satu dari sepuluh genotipe mutan menunjukkan kemiripan genetik paling tinggi dengan Lingga yaitu genotipe L106. Analisis tingkat polimorfisme menunjukkan bahwa terdapat enam penanda mikrosatelit dengan tingkat informativitas tinggi (PIC >0,7) yaitu CaeMS138, EPMS404, GPMS197, CAMS011, GPMS194, dan HPMS1-62 yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik genotipe mutan cabai lain

ke depannya maupun sebagai alat bantu seleksi pada generasi selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian ini melalui Beasiswa Tugas Belajar Badan Litbang Pertanian. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Balai Penelitian Tanaman Sayuran (Balitsa) yang telah menyediakan materi genetik untuk kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abuzayed, M.A, M. Goktay, J. Allmer, S. Doganlar and A. Frary. 2017. Development of genomic Simple Sequence Repeat markers in faba bean by Next-Generation Sequencing. *Plant Molecular Biology Reporter*. 35: 61-71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-016-1003-1>.
- Asadi. 2013. Pemuliaan mutasi untuk perbaikan terhadap umur dan produktivitas pada kedelai. *Jurnal AgroBiogen*. 9(3):135-142.
- Chen, Y., X. Dai, J. Hou, H. Guan, Y. Wang, Y. Li and T. Yin. 2016. DNA fingerprinting of oil camellia cultivars with SSR markers. *Tree Genetics and Genomes*. 12(1):7. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0966-7>.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Du, L., Q. Liu, K. Zhao, J. Tang, X. Zhang, B. Yue and Z. Fan. 2019. PSMD: An extensive database for pan-species microsatellite investigation and marker development. *Molecular Ecology Resources*. 2019 (0):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13098>.
- Dwinianti, E.F., R. Mastuti and E.L. Arumingtyas. 2019. Genetic variation analysis of ems-induced chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) mutants using SSR markers. *Journal of Tropical Life Science*. 9(3):223-228. DOI: <https://doi.org/10.11594/jtls.09.03.02>.
- Girija, M. & D. Dhanavel. 2015. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, ethyl methane sulfonate, and their combine treatments in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Global Journal of Molecular Science*. 4(2): 68-75.
- Guo, Y., Y. Wu, J.A. Anderson, J.Q. Moss, L. Zhu and J. Fu. 2017. SSR marker development, linkage mapping, and QTL analysis for establishment rate in common bermudagrass. *The Plant Genome* 10(1): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.3835/plantgenome2016.07.0074>.
- Handini, E., P. Aprilianti dan S. Widiarsih. 2020. Peningkatan keragaman *Grammatophyllum scriptum* (L.) Blume asal Sulawesi dengan iradiasi sinar gamma. *Buletin Kebun Raya* 23(2):136-145. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.14203/bkr.v23i2.265>.
- Hildebrand, E., D.C. Torney and R.P. Wagner. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science* 20: 100-102.
- Husain, I., A. Purwito, A. Husni dan K.H. Mutaqin. 2016. Evaluasi keragaman genetik mutan harapan generasi MV1 jeruk keprok SoE (*Citrus reticulata* Blanco) berdasarkan penanda morfologi dan ISSR. *Jurnal Hortikultura Indonesia* 7(2):102-110.
- Juliandari, R.R., R. Mastuti and E.L. Arumingtyas. 2019. Microsatellite marker for genetic variation analysis in local chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) induced by ethyl methane sulfonate (EMS). *Journal of Tropical. Life Science*. 9(2): 189-194. DOI: <https://doi.org/10.11594/jtls.09.02.08>.

- Lazar, I. 2010. "GelAnalyzer 2010 User's Manual." 2010. <http://www.gelanalyzer.com/downloads/users_manual_2010.pdf>. Diakses pada 2 Februari 2021.
- Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M.Kim, and B.D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 619-627. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1467-x>.
- Lestari, E.G. 2016. *Pemuliaan Tanaman Melalui Induksi Mutasi dan Kultur in Vitro*. Jakarta: IAARD Press.
- Liu, K & S.V. Muse. 2005. *PowerMarker: An Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis*. Raleigh: Bioinformatics Research Center, North Carolina State University.
- Maesaroh, A., A. Amurwanto, dan A. Yuniaty. 2014. Analisis RAPD kecipir polong panjang *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC hasil mutasi iradiasi sinar gamma. *Scripta Biologica* 1(1): 1-7.
- Manzila, I., T.P. Priyatno, K. Nugroho, R.T. Terryana, P. Lestari, and S.H. Hidayat. 2020. Molecular and morphological characterization of ems-induced chili pepper mutants resistant to Chili Veinal Mottle Virus. *Biodiversitas*. 21(4): 1448-1457. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210424>.
- Mimura, Y., T. Inoue, Y. Minamiyama and N. Kubo. 2012. An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*. 62(1): 93-98. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.93>.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, and M. Hirai. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*. 18:157-169. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9024-3>.
- Minamiyama, Y., M. Tsuru, T. Kubo and M. Hirai. 2007. QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breeding Science*. 57:129-134.
- Nagy, I., A. Stigel, Z. Sasvari, M. Roder and M. Ganal. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 50:668-688. DOI: <https://doi.org/10.1139/g07-047>.
- Nugroho, K., Trikoesoemaningtyas, M. Syukur dan P. Lestari. 2021. Analisis keragaman genetik karakter morfologi populasi M2 cabai hasil iradiasi sinar gamma. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 49 (3):273-279. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.24831/jai.v49i3.38448>.
- Permatasari, S., N.R. Ardiarini dan Kuswanto. 2018. Analisis hubungan kekerabatan antar galur kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) lokal. *Jurnal Produksi Tanaman* 6 (11): 2923-2930.
- Pojskic, N. 2018. iMAF - Index of major allele frequency. *Genetics & Applications* 2(2):78-81. DOI: <https://doi.org/10.31383/ga.vol2iss2pp78-81>.
- Rahmattullah, N., R. Khrisnamurty, K. Senthil and E.L. Arumingtyas. 2020. Studies on genetic variability of *Capsicum frutescens* var. Cakra Hijau induced by ethyl methane sulphonate (EMS) using SSR marker. *Current Botany* 11: 125-131. DOI: <https://doi.org/10.25081/cb.2020.v11.6303>.
- Rohlf, F.J. 2000. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem. Version: 2.1*. New York: Exeter Software.

- Rosmaina, D. Mulyadi, R. Elfianis dan Zulfahmi. 2020. Keragaman genetik mutan M-2 cabai merah keriting (*Capsicum annum* L.) berdasarkan penanda RAPD. *Jurnal Agroteknologi* 10(2): 92-101.
- Sari, V., Miftahudin dan Sobir. 2017. Keragaman genetik bawang merah (*Allium cepa* L.) berdasarkan marka morfologi dan ISSR. *Jurnal Agronomi Indonesia* 45(2):175-181.
- Singh, N., D.R. Choudhury, A.K. Singh, S. Kumar, K. Srinivasan, R.K. Tyagi, N.K. Singh and R. Singh. 2013. Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS One*. 8(12): 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084136>.
- Singh, N., D.R. Choudhury, G. Tiwari, A.K. Singh, S. Kumar, K. Srinivasan, R.K. Tyagi, A.D. Sharma, N.K. Singh and R. Singh. 2016. Genetic diversity trend in Indian rice varieties : an analysis using SSR markers. *BMC Genetics*. 17: 127. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0437-7>.
- Sobir & M. Syukur. 2015. *Genetika Tanaman*. Bogor: IPB Press.
- Spencer-Lopes, M.M., L. Jankuloski, A. Mukhtar Ali Ganim, M. Matijevic and A. Kodym. 2018. Physical mutagenesis, p. 5-14. In M.M. Spencer-Lopes, B.P. Forster and L. Jankuloski (Eds.). *Manual on Mutation Breeding Third Edition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Sutapa, G.N. & I.G.A. Kasmawan. 2016. Efek induksi mutasi radiasi gamma ^{60}Co pada pertumbuhan fisiologis tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* L.). *Jurnal Kesehatan Radiasi & Lingkungan* 1(2): 5-11.
- Tasma, I.M. & S. Arumsari. 2013. Analisis diversitas genetik aksesori kelapa sawit Kamerun berdasarkan marka SSR. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* 19(4):194-202.
- Terryana, R.T., N.D.S.A. Ningrum, K. Nugroho, D. Saptadi, H. Kurniawan dan P. Lestari. 2020. Analisis keragaman genetik dan pengembangan profil sidik jari DNA 20 varietas cabai lokal Indonesia berdasarkan marka SSR. *Jurnal AgroBiogen* 16(2): 45-58. DOI: <https://doi.org/10.21082/jbio.v16n2.2020.p45-58>.
- Thakur, A.K., K.H. Singh, L. Singh, J. Nanjundan and Y.J. Khan. 2018. SSR marker variations in Brassica species provide insight into the origin and evolution of Brassica amphidiploids. *Hereditas* 155(1):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41065-017-0041-5>.
- Vieira, M.L.C., L. Santini, A.L. Diniz and C. de Freitas Munhoz. 2016. Microsatellite markers : what they mean and why they are so useful. *Genetics Molecular Biology*. 39(3): 312-328. DOI: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.
- Wu, J., Q. Wang, J. Xie, Y.B. Pan, F. Zhou, Y. Guo, H. Chang, H. Xu, W. Zhang, C. Zhang and Y. Qiu.. 2019. SSR marker-assisted management of parental germplasm in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) breeding programs. *Agronomy*. 9(8):1-16. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9080449>.
- Yulita, K.S., D. Martanti, S.P. Yuyu dan Herlina. 2014. Deteksi mutan kentang hitam hasil radiasi sinar γ menggunakan marka ISSR dan RAPD. *Jurnal Hortikultura*. 24(1):1-9.