

Keragaman Genetik 50 Aksesori Plasma Nutfah Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.) Berdasarkan Marka SSR

*Genetic Diversity of 50 Accessions of Mungbean (*Vigna radiata* L.) Germplasm Based on SSR Markers*

Puji Lestari^{1*}, Ani Sulastri², Baso Manguntungi², Kristianto Nugroho³

¹Organisasi Riset Pertanian dan Pangan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Cibinong Science Center, Jalan Raya Jakarta-Bogor, Cibinong, Bogor 16915

²Program Studi Teknobiologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Teknologi Sumbawa, Jalan Raya Olat Maras, Batu Alang, Moyo Hulu, Sumbawa, 84371, Nusa Tenggara Barat

³Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Organisasi Riset Pertanian dan Pangan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jalan Raya Jakarta-Bogor, Cibinong, Bogor 16915

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

Diajukan: 13 April 2022/**Diterima:** 12 Agustus 2022/**Dipublikasi:** 29 Agustus 2022

ABSTRACT

Mungbean (*Vigna radiata* L.) is top third tropical legume crop next to soybean and peanut. The existence mungbean is important for food security in Indonesia as reflected from increased productivity, leading to be challenging in plant breeding. Their sufficient availability of genetic diversity is pre-requisite for the successful breeding program. This study aimed to analyze the genetic diversity of 50 accessions of mungbean germplasm using Simple Sequence Repeats (SSR). The banding pattern of PCR products were scored as binary data and subjected to analyzed using Gel Analyzer, NTSYS, and PowerMarker software. The genetic diversity of mungbean based on 10 SSR markers showed polymorphism and were able to detect the genetic variation of 50 mungbean accessions. The polymorphic markers detected 155 alleles in range of 11-20 alleles with average 15,5 allele per locus. Average value of gene diversity was 0.92 and the average of major allele frequency resulted 0.13%. PIC value ranged 0.88-0.92 with the average of 0.90. All of the SSR markers used in this study revealed PIC > 0.7, indicating their informativeness, thus they are potential for genetic diversity analysis of mungbean germplasm and as Marker Assisted Selection (MAS). Based on clustering analysis, the 50 accessions of mungbean grouped into two major clusters with coefficient genetic similarity of 0.83. This genetic diversity is useful for assisting their preservation and breeding on mungbean in Indonesia.

Keywords: *genetic diversity; germplasm; molecular marker; phylogenetic; SSR; *Vigna radiata* L.*

INTISARI

Kacang hijau (*Vigna radiata* L) merupakan tanaman tropis yang merupakan tanaman kacang-kacangan terbanyak ketiga setelah kacang kedelai dan kacang tanah. Kehadiran kacang hijau penting sebagai penyangga pangan di Indonesia dan tercemrin dari laju peningkatan produksi yang sangat pesat sehingga menjadi tantangan dalam

pemuliaan tanaman. Tersedianya sumber keragaman genetik menjadi prasyarat dalam keberhasilan program pemuliaan. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik lima puluh aksesori kacang hijau dengan menggunakan marka *Simple Sequence Repeats* (SSR). Pola pita hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) diberi skor sebagai data biner. Analisis data dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GelAnalyzer, NTSYS, dan PowerMarker. Hasil keragaman genetik kacang hijau berdasarkan 10 marka SSR menunjukkan polimorfisme dan variasi genetik 50 aksesori kacang hijau. Marka polimorfik tersebut dapat mendeteksi 155 alel dengan kisaran 11–20 alel per lokus dengan rerata 15,5 alel per marka. Rerata nilai diversitas gen yang dihasilkan adalah 0,92 dan rerata nilai frekuensi alel utama yang dihasilkan adalah 0,13%. Nilai PIC yang diperoleh berkisar antara 0,88 dan 0,92 dengan rerata 0,90. Kesepuluh marka SSR yang digunakan memiliki nilai PIC >0,7 dan merupakan marka yang informatif sehingga potensial untuk analisis keragaman genetik plasma nutfah kacang hijau maupun untuk seleksi berbantu marka. Berdasarkan hasil analisis kluster, 50 aksesori plasma nutfah kacang hijau mengelompok menjadi dua kelompok utama pada koefisien kemiripan genetik 0,83 pada tanaman kacang hijau tersebut. Keragaman genetik ini penting untuk membantu preservasi maupun pemuliaan kacang hijau di Indonesia.

Kata kunci: filogenetik; keragaman genetik; plasma nutfah; SSR; *Vigna radiata* L.

PENDAHULUAN

Kacang hijau (*Vigna radiata* L.) merupakan salah satu tanaman kacang-kacangan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia selain kedelai dan kacang tanah. Sentra produksi kacang hijau di Indonesia tersebar mulai dari Jawa Tengah, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Nusa Tenggara Barat, Jawa Barat, dan Nusa Tenggara Timur (Kementrian Pertanian, 2020). Dibanding tanaman pangan lainnya, kacang hijau memiliki sejumlah keunggulan antara lain umur panen yang genjah (55-65 hari), cara budidaya yang mudah, toleran terhadap kekeringan, serangan hama dan penyakit yang lebih sedikit, serta dapat ditanam pada lahan marginal yang kurang subur (Barus *et al.*, 2014). Keunggulan lain yang dimiliki kacang hijau yaitu kandungan zat gizinya yang lengkap mulai dari protein, karbohidrat, lemak, vitamin B, dan beberapa

mineral seperti kalsium, fosfor, dan zat besi (Ratnasari *et al.*, 2021). Kandungan protein kacang hijau cukup tinggi yaitu antara 20-25% dan mampu memenuhi 20% kebutuhan protein manusia per hari (Ritonga *et al.*, 2019; Ratnasari *et al.*, 2021).

Permintaan pasar terhadap kacang hijau terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun sedangkan produksi di dalam negeri masih rendah. Menurut Kementrian Pertanian (2020) produksi kacang hijau nasional pada tahun 2019 mencapai 296 928 ton/ha dengan luas tanam sebesar 254 717 ha. Sementara itu pada tahun 2017, Kementrian Pertanian (2018) mencatat tingkat konsumsi kacang hijau mencapai 0,256 kg/kapita/tahun. Menurut Arsyadmunir (2016) terdapat beberapa faktor yang menyebabkan masih rendahnya produksi kacang hijau di Indonesia yaitu kurang tersedianya varietas unggul, teknik budidaya

yang diterapkan masih belum optimal, masih terdapat serangan hama dan penyakit, serta adanya perubahan iklim yang menyebabkan terjadinya kekeringan atau banjir. Beberapa varietas unggul kacang hijau telah dilepas oleh Kementerian Pertanian seperti varietas Murai, Kutilang, Vima-1, Vima-3, dan Vima-5, namun benih varietas unggul tersebut seringkali sulit ditemui oleh petani di pasaran sehingga para petani lebih memilih menggunakan benih varietas lokal (Polnaya & Patty, 2012). Oleh karena itu perakitan varietas unggul baru kacang hijau lokal yang mampu berproduksi tinggi dan beradaptasi terhadap perubahan iklim, baik melalui teknik persilangan buatan maupun pemurnian varietas lokal perlu terus diupayakan.

Ketersediaan plasma nutfah kacang hijau yang memiliki keragaman genetik yang tinggi menjadi salah satu syarat utama dalam kegiatan perakitan varietas unggul kacang hijau. Bank Gen Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian di Cimanggu Bogor sendiri menyimpan sejumlah koleksi benih plasma nutfah lokal kacang hijau Indonesia yang belum dianalisis keragaman genetiknya. Analisis keragaman genetik penting untuk dilakukan dalam rangka mengetahui tingkat keragaman genetik dari plasma nutfah yang dikoleksi, mengetahui jarak genetik antar aksesori dalam rangka pemberian rekomendasi calon tetua persilangan, serta mengidentifikasi ada tidaknya duplikasi pada koleksi yang ada. Selain itu menurut Gusmiaty *et al.* (2016) analisis keragaman genetik juga bermanfaat

dalam menentukan strategi pemuliaan tanaman ke depannya. Analisis keragaman genetik menggunakan marka molekuler memiliki sejumlah kelebihan yaitu tingkat polimorfisme yang lebih tinggi, mampu membedakan aksesori dengan hubungan kekerabatan yang sangat dekat, tidak dipengaruhi lingkungan, dapat dilakukan tanpa menunggu tanaman mencapai stadia dewasa, serta dapat menjadi data dukung bagi kegiatan karakterisasi secara morfologi (Anumalla *et al.*, 2015).

.Salah satu marka molekuler yang banyak dimanfaatkan dalam kegiatan analisis keragaman genetik tanaman yaitu *Simple Sequence Repeats* (SSR). Marka ini memiliki sejumlah kelebihan antara lain bersifat kodominan, tingkat polimorfisme tinggi, tingkat reproduktibilitas tinggi, dikembangkan berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR), keberadaannya yang melimpah dalam genom tanaman, dan memiliki kemampuan transferabilitas antar spesies yang cukup tinggi (Shrivastava *et al.*, 2014). Pemanfaatan marka SSR dalam menganalisis keragaman genetik pada kacang hijau telah banyak dilaporkan pada penelitian sebelumnya antara lain oleh Shrivastava *et al.* (2014), Gupta *et al.* (2014), Lestari *et al.* (2014), Chen *et al.* (2015), Yuliasti & Reflinur (2015), Reflinur *et al.* (2017), dan Wang *et al.* (2018). Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi tentang keragaman genetik 50 aksesori plasma nutfah kacang hijau asal Indonesia dengan menggunakan marka SSR. Penelitian terhadap kacang hijau ini

dapat menjadi informasi dalam program pemuliaan tanaman kacang hijau untuk memperoleh rekomendasi tetua persilangan yang dapat dimanfaatkan kedepannya dalam kegiatan perakitan varietas unggul kacang hijau di Indonesia.

BAHAN DAN METODE

Materi Genetik

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini berupa 50 aksesori kacang hijau Indonesia koleksi Bank Gen BB Biogen (Tabel 1). Sebanyak 13 aksesori berasal dari Nusa Tenggara Barat, 13 aksesori berasal dari Jawa Barat, enam aksesori dari Sulawesi Selatan, enam aksesori dari Jawa Tengah, empat aksesori dari Nusa Tenggara Timur, empat aksesori dari Sulawesi Tenggara, dua aksesori berasal dari Jawa Timur, dan dua aksesori introduksi asal Taiwan. Benih dari tiap aksesori dikecambahkan pada tray menggunakan media campuran tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya bagian daun muda pada urutan kedua dan ketiga dari pucuk dipanen untuk digunakan dalam kegiatan analisis molekuler. Kegiatan analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor.

Isolasi DNA Genomik

DNA genomik diisolasi menggunakan metode Doyle & Doyle (1990) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 gram daun kacang hijau digerus pada mortar steril menggunakan 500 µl buffer 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). Hasil penggerusan selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml diikuti penambahan kembali buffer ekstraksi hingga volume 1000 µl. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65 °C selama 15 menit sambil dibolak-balik setiap 5 menit agar homogen. Sampel selanjutnya diekstrak menggunakan 800 µl larutan kloroform: isoamil alkohol (24:1), dilanjutkan dengan tahap sentrifugasi menggunakan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20 °C. Supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro baru.

Selanjutnya tiap sampel ditambahkan larutan 3M natrium asetat pH 5,2 sebanyak 1/10 kali volume supernatan dan diikuti penambahan isopropanol dingin sebanyak satu kali volume supernatan. Campuran lalu diinkubasi pada suhu -20 °C selama satu jam. Selanjutnya, campuran disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20 °C. Cairan supernatan lalu dibuang, kemudian pelet DNA yang terbentuk dicuci memakai larutan 70% etanol sebanyak 500 µl. Pelet DNA lalu dikeringanginkan semalam untuk menghilangkan sisa-sisa etanol. Pelet yang telah kering lalu dilarutkan menggunakan 100 µl larutan TE (10 mM Tris pH 8,0 dan 1 mM EDTA) yang telah ditambahkan enzim RNase A (10 mg/ml). Larutan DNA stok kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam lalu disimpan pada suhu -20 °C sampai siap digunakan.

Tabel 1. Daftar 50 aksesori kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini

No	Nama aksesori	Asal Daerah	No	Nama aksesori	Asal Daerah
1	Kacang Bubur A	Nusa Tenggara Barat	26	Sampeong	Sumbawa, Nusa Tenggara Barat
2	Kacang Bubur B	Nusa Tenggara Barat	27	Lok_Bombongan_A	Tanatoraja, Sulawesi Selatan
3	Antap_Ongko_1A	Nusa Tenggara Barat	28	Lok_Bombongan_A	Tanatoraja, Sulawesi Selatan
4	Antap_Ongko_1B	Nusa Tenggara Barat	29	Lok_Bombongan_A	Tanatoraja, Sulawesi Selatan
5	Antap_Ongko_2A	Nusa Tenggara Barat	30	Lokal_Majenang_A	Sulawesi Tenggara
6	Antap_Ongko_2B	Nusa Tenggara Barat	31	Lokal_Majenang_B	Sulawesi Tenggara
7	Antap_Klungkung_A	Nusa Tenggara Barat	32	Lokal_Batang_A	Banyumas, Jawa Tengah
8	Antap_Klungkung_B	Nusa Tenggara Barat	33	Lokal_Batang_B	Banyumas, Jawa Tengah
9	IR_Klungkung	Nusa Tenggara Barat	34	Lokal_Batang_C	Banyumas, Jawa Tengah
10	VC_1359_MUN221	Introduksi Taiwan	35	Lokal_Garut	Garut, Jawa Barat
11	Lok_Bima_2A	Bima, Nusa Tenggara Barat	36	Lok_Garut	Garut, Jawa Barat
12	Lok_Bima_2B	Bima, Nusa Tenggara Barat	37	Lokal_Garut	Garut, Jawa Barat
13	Lok_Bima_2C	Bima, Nusa Tenggara Barat	38	Lokal_Garut	Garut, Jawa Barat
14	Sriti	Malang, Jawa Timur	39	Lok_Garut	Garut, Jawa Barat
15	PR_2	Sukabumi, Jawa Barat	40	PB_1_Benggolo_Pati_M	Pati, Jawa Tengah
16	Lok_Kota_Kumbah_A	Nusa Tenggara Timur	41	PB_2_Benggolo_Pati_K	Pati, Jawa Tengah
17	Lok_Kota_Kumbah_B	Nusa Tenggara Timur	42	Butek_Bungbulang	Garut, Jawa Barat
18	Lok_Kab_Borong_A	Nusa Tenggara Timur	43	Butek_Bungbulang	Garut, Jawa Barat
19	Lok_Kab_Borong_A	Nusa Tenggara Timur	44	PR_2	Sukabumi, Jawa Barat
20	Tibuang_Cahdi_A	Jeneponto, Sulawesi Selatan	45	Lokal_Kudus	Kudus, Jawa Tengah
21	Betet	Sumedang, Jawa Barat	46	Walet	Sumedang, Jawa Barat
22	Tibuang_Cahdi_C	Jeneponto, Sulawesi Selatan	47	Vima_1	Malang, Jawa Timur
23	Tibuang_Cahdi_D	Jeneponto, Sulawesi Selatan	48	Si_Walik	Sumedang, Jawa Barat
24	Lok_Mutaha_K_1	Sulawesi Tenggara	49	Manyar	Introduksi, Taiwan
25	Lok_Majenang_B	Sulawesi Tenggara	50	Bhakti	Sumedang, Jawa Barat

Amplifikasi PCR dan Elektroforesis Gel

Poliakrilamid

Setiap sampel diamplifikasi pada total reaksi 10 μ l mengandung 10 ng/ μ l DNA *template* sebanyak 2 μ l; Kapa 2G Fast Readymix (Kapa Biosystem, USA) sebanyak 5 μ l; primer *Forward* dan *Reverse* dengan konsentrasi 10 μ M masing-masing sebanyak 0,5 μ l, dan ddH₂O steril. Amplifikasi dilakukan menggunakan sepuluh pasang primer mikrosatelit kacang hijau hasil desain baru (Tabel 2). 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 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 8% pada tangki berisi buffer 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).

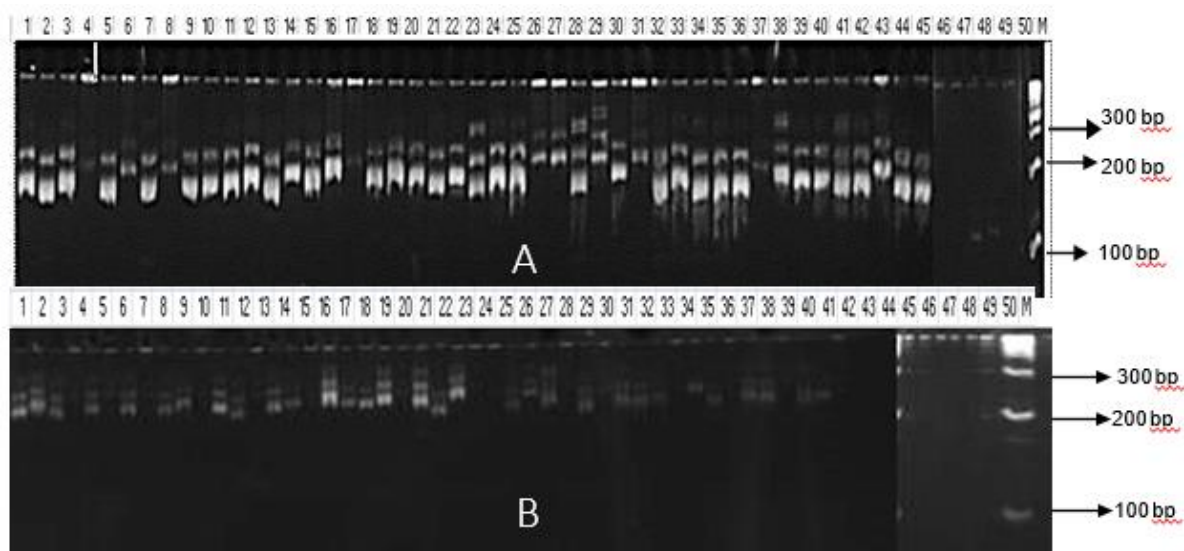
Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan skoring pita DNA yang muncul pada hasil elektroforesis gel poliakrilamid 8% (Gambar 1). Pita-pita yang terlihat pada gel dianggap sebagai satu alel. Pita-pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Laju migrasi yang sama, setiap pita yang tampak diberi nilai 1, sedangkan pita yang tidak tampak diberi nilai 0 dan sampel yang tidak teramplifikasi diberi nilai 9 dan dianggap sebagai data yang hilang sehingga hasil skoring pita berupa data biner. Data hasil skoring dianalisis dengan menggunakan program *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic- Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested* (UPGMA-SAHN) pada perangkat lunak NTSYS versi 2.1 (Rohlf, 2000). Hasil analisis disajikan dalam bentuk dendogram.

Selanjutnya, data hasil skoring juga dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak PowerMarker 3.25 (Liu & Muse, 2005) untuk mengetahui nilai frekuensi alel utama, indeks diversitas gen, dan *Polymorphic Information Content* (PIC) yang dihasilkan oleh primer SSR yang digunakan dalam penelitian ini. Kriteria Botstein *et al.* (1980) digunakan sebagai acuan untuk menentukan tingkat informativitas dari marka SSR yang digunakan dengan ketentuan yaitu PIC >0,5 untuk penanda yang informativitasnya tinggi, $0,25 \leq \text{PIC} \leq 0,5$ untuk penanda yang informativitasnya sedang, dan PIC <0,25 untuk penanda dengan tingkat informativitas rendah.

Tabel 2. Daftar primer SSR kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini

Primer SSR	Motif	Tm ($^{\circ}$ C)	Sekuens (5' – 3')
P17	(TAA) ₃₀	56,9	F: TGGTTGGAAGTGGTGGGA
		56,3	R: CGTGGAATGTGGGTGTCA
P27	(TAA) ₂₆	54,9	F: AACGCTTTGTTCCATTCAGA
		57,2	R: CCCTCAGCCAGAGTCCAA
P29	(TAA) ₂₀	57,3	F: CTTTCTGCTGCTGTGCCA
		57,8	R: TCACTCAACAGGCCTCTAC
P33	(ATA) ₂₃	57,3	F: CGTGAAGGGGTGTGTTGG
		56,7	R: CCATGTTCTCGGTAATGGCT
P59	(AAT) ₁₃	55,1	F: TTCAGCCACTAATTCACGG
		58,2	R: TCCACGCGCTCCTACTTC
P57	(ATT) ₁₉	52,1	F: TGATTTTGATGCGATGGG
		53,0	R: GCGTTTGCATTGAATTGG
P45	(TAA) ₁₉	54,6	F: TGGCGAGATTTTGTCTGA
		54,1	R: ATGAGCGGAAATTGTTCCA
P36	(TAA) ₂₁	58,0	F: TCTGCTTTTGACGGAACCTCT
		55,9	R: TTTAGGCTGGTCATGGGC
P87	(ATA) ₂₇	57,3	F: AGTTCGGTTTGGCACGAC
		55,4	R: TTCGAATGTACACAACGCAA
P95	(AAT) ₁₉	54,7	F: CTGAAAAGTTGCGGTTTTGT
		55,8	R: CGTTTGTGAAGGTTGTGGAA



Gambar 1. Pola pita amplikon yang dihasilkan pada kegiatan elektroforesis gel poliakrilamid dari sampel DNA kacang hijau yang diamplifikasi menggunakan primer: (A) P59 dan (B) P87.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Polimorfisme Marka SSR Kacang Hijau

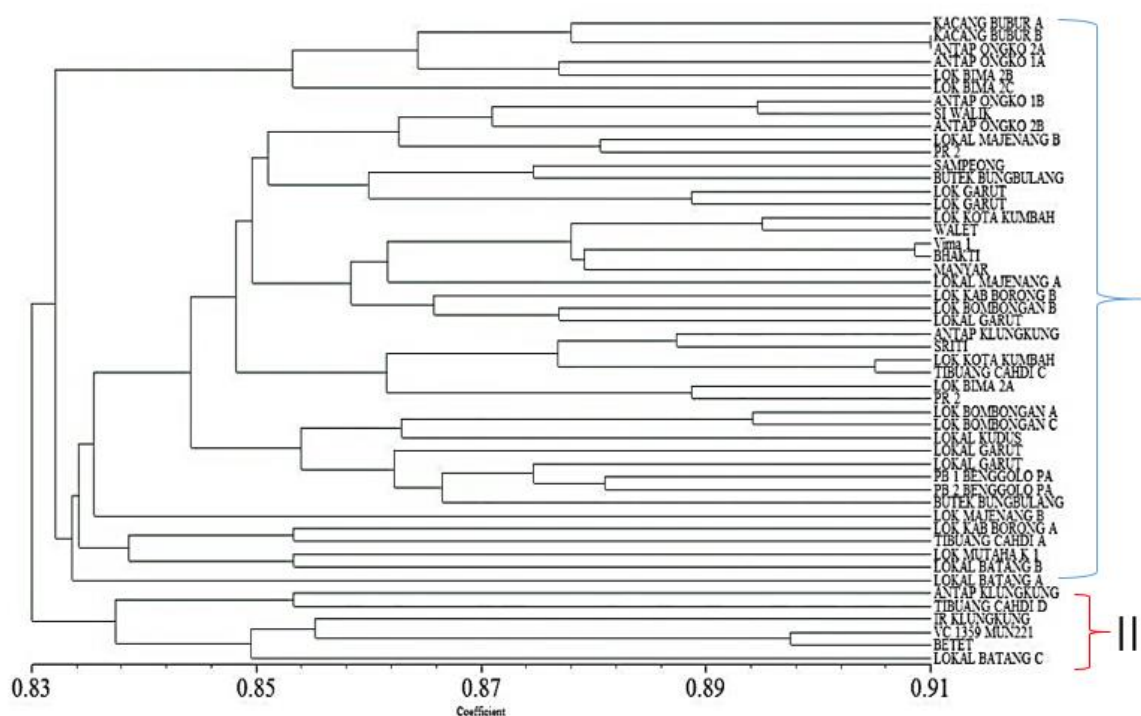
Hasil analisis polimorfisme menggunakan marka SSR menunjukkan sebanyak 155 alel berhasil dideteksi pada 50 aksesori kacang hijau menggunakan 10 marka SSR dengan rata-rata 15,5 alel per marka dan kisaran 11-20 alel per lokus (Tabel 3). Jumlah alel yang berhasil dideteksi pada penelitian ini lebih banyak dibanding pada penelitian Gupta *et al.* (2014) yang berhasil mendeteksi 72 alel menggunakan 27 marka EST-SSR pada 28 aksesori kacang hijau asal India, Thailand, Filipina, Australia, dan Korea. Selain itu, jumlah alel yang mampu dideteksi pada penelitian ini juga lebih banyak dari penelitian Reflinur *et al.* (2017) yang mendeteksi 72 alel pada 22 aksesori kacang hijau lokal menggunakan 14 penanda SSR. Adanya perbedaan jumlah alel yang berhasil dideteksi antara penelitian yang satu dan yang lain disebabkan oleh beberapa faktor seperti jumlah primer SSR yang digunakan, pemilihan primer yang digunakan, jumlah aksesori yang dianalisis serta latar belakang genetik dari aksesori tersebut (Malik *et al.*, 2019). Pada penelitian ini, aksesori yang digunakan memiliki latar belakang genetik yang beragam karena berasal dari beberapa daerah di Indonesia, dimana antara daerah yang satu dengan yang lain berada pada pulau yang terpisah oleh laut sehingga tidak memungkinkan terjadinya aliran gen (*gene flow*). Hal ini senada dengan hasil penelitian

Yono *et al.* (2017) yang melaporkan bahwa pada analisis SSR populasi kelapa sawit hasil persilangan, jumlah alel yang terdeteksi jauh lebih sedikit dibanding jumlah alel yang berasal dari populasi liar. Menurut Santoso *et al.* (2006), semakin banyak jumlah alel yang terdeteksi pada koleksi plasma nutfah lokal, akan bermanfaat khususnya bila alel-alel tersebut berkaitan dengan gen-gen penting yang mengendalikan sifat unggul tertentu.

Frekuensi alel utama, yang menurut Yoon *et al.* (2012) menunjukkan alel dengan frekuensi paling tinggi, berkisar dari 0,11 (P57 dan P95) hingga 0,16 (P33 dan P45) dengan rata-rata sebesar 0,13 (Tabel 3).. Sementara itu indeks diversitas gen yang menurut Pagnotta (2018) merupakan nilai heterozigositas yang diharapkan bila populasi dalam keadaan seimbang, menunjukkan nilai yang bervariasi dengan kisaran dari 0,89 (P17 dan P45) hingga 0,92 (P27, P29, P57, P36, dan P95) dengan rata-rata sebesar 0,92 (Tabel 3). Nilai PIC yang menunjukkan level polimorfisme dari marka SSR kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini berkisar dari 0,88 (P17) hingga 0,92 (P36) dengan rata-rata sebesar 0,90 (Tabel 3). Menurut kriteria Botstein *et al.* (1980), seluruh marka SSR kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini memiliki tingkat informativitas tinggi karena memiliki nilai PIC >0,5. Kesepuluh marka SSR tersebut dapat digunakan kedepannya dalam kegiatan analisis keragaman genetik aksesori kacang hijau lainnya atau sebagai alat seleksi progeni pada kegiatan persilangan.

Tabel 3. Ringkasan statistik polimorfisme marka SSR kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini

Marka SSR	Kisaran ukuran alel (bp)	Jumlah alel	Frekuensi alel utama	Diversitas gen	PIC
P17	171-289	11	0.14	0.89	0.88
P27	229-328	20	0.13	0.92	0.91
P29	176-233	14	0.12	0.92	0.91
P33	188-310	16	0.16	0.90	0.89
P59	217-301	15	0.13	0.91	0.91
P57	165-263	17	0.11	0.92	0.91
P45	166-249	14	0.16	0.89	0.89
P36	214-314	17	0.13	0.92	0.92
P87	173-232	14	0.15	0.90	0.89
P95	169-302	17	0.11	0.92	0.91
Jumlah		155			
Rerata		15,5	0,13	0,92	0,90



Gambar 3. Pohon filogenetik yang menunjukkan pengelompokan 50 aksesori kacang hijau lokal berdasarkan sepuluh marka SSR menggunakan program UPGMA-SAHN

Analisis Filogenetik 50 Aksesori Kacang Hijau

Analisis filogenetik bertujuan untuk melihat hubungan kekerabatan antar aksesori berdasarkan hubungan evolusinya, dimana aksesori-aksesori dengan kesamaan genetik paling tinggi akan cenderung mengelompok pada klaster yang sama (Pangestika *et al.*,

2015). Hasil analisis filogenetik 50 aksesori kacang hijau menunjukkan pengelompokan pada dua klaster utama pada koefisien kesamaan genetik 0,83 (Gambar 2). Klaster pertama terdiri atas 44 aksesori sedangkan klaster kedua terdiri atas enam aksesori yaitu Antap Klungkung, Tibuang Cahdi D, Betet,

dan Lokal Batang C yang mengelompok bersama aksesori introduksi VC_1359_MUN221 asal Taiwan.

Pada klaster pertama, pengelompokan aksesori-aksesori berdasarkan wilayah asal mulai terlihat pada beberapa subklaster seperti aksesori asal Nusa Tenggara Barat (Kacang Bubur A, Kacang Bubur B, Antap Ongko 1A, Antap Ongko 2A, Lokal Bima 2A, dan Lokal Bima 2C) yang mengelompok pada subklaster yang sama. Begitu pula beberapa aksesori asal Jawa Barat dan Jawa Tengah seperti aksesori Lokal Garut, Lokal Kudus, PB_1_Benggolo_Pati_M dan PB_2_Benggolo_Pati_K yang mengelompok pada subklaster yang sama. Hasil serupa dilaporkan sebelumnya pada penelitian Lestari et al. (2014) dimana pengelompokan aksesori kacang hijau khususnya aksesori asal Nusa Tenggara Barat dan Jawa yang cenderung mengelompok berdasarkan wilayah asal. Sementara itu aksesori asal Sulawesi Selatan, Nusa Tenggara Timur, dan Jawa Timur cenderung menyebar pada subklaster-subklaster yang ada di klaster pertama serta tidak menunjukkan pengelompokan spesifik pada subklaster tertentu.

Di antara kelima puluh aksesori kacang hijau yang dianalisis, terdapat dua aksesori dengan nilai kesamaan genetik paling tinggi yaitu antara aksesori Kacang Bubur A dan Kacang Bubur B dengan nilai similaritas sebesar 90%. Kedua aksesori asal Nusa Tenggara Barat tersebut tidak potensial untuk digunakan sebagai tetua persilangan karena memiliki jarak genetik yang dekat.

Sementara itu aksesori dengan nilai kesamaan genetik terendah ditunjukkan oleh aksesori Tibuang Cahdi C asal Jeneponto Sulawesi Selatan dan Lokal Bima 2A asal Bima Nusa Tenggara Barat dengan nilai similaritas sebesar 83%. Pemilihan tetua persilangan perlu memperhatikan jarak genetik untuk meningkatkan peluang terjadinya heterosis dan memperkecil peluang terjadinya *inbreeding depression*.

Analisis keragaman genetik plasma nutfah kacang hijau Indonesia menggunakan marka SSR merupakan bagian dari kegiatan pra-pemuliaan tanaman seperti yang dikemukakan oleh Sharma *et al.* (2013). Kegiatan pra-pemuliaan bertujuan untuk mengoptimalkan pemanfaatan sumber daya genetik yang dipersiapkan untuk kegiatan perakitan varietas unggul baru (Asadi *et al.*, 2016). Aksesori-aksesori yang dikoleksi perlu diidentifikasi dan dievaluasi baik secara morfologi maupun molekuler untuk mengetahui keunggulan masing-masing sehingga pengembangan strategi pemuliaan ke depannya dapat dilakukan secara optimal. Beberapa aksesori kacang hijau yang berasal dari Nusa Tenggara Barat dan Nusa Tenggara Timur misalnya memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber gen ketahanan terhadap cekaman kekeringan. Oleh karena itu, ketersediaan informasi karakter morfologi dalam bentuk basis data yang dapat diintegrasikan dengan data marka molekuler dapat mempermudah estimasi performa setiap aksesori dan mempermudah penentuan arah kegiatan pemuliaan ke depannya (Asadi *et al.*, 2018).

Kehadiran marka SSR yang mampu membedakan aksesori kacang hijau secara genetik dan dapat berfungsi sebagai *marker assisted selection* (MAS) diharapkan mampu mengakselerasi program pemuliaan kacang hijau di Indonesia ke depannya.

KESIMPULAN

Analisis keragaman genetik 50 aksesori kacang hijau Indonesia menunjukkan pemisahan antara menjadi dua klaster utama pada koefisien kesamaan genetik 0,83. Sebanyak dua aksesori menunjukkan nilai kesamaan genetik paling tinggi yaitu antara aksesori Kacang Bubur A dan Kacang Bubur B dengan nilai similiaritas sebesar 90%. Kedua aksesori tersebut tidak potensial untuk digunakan sebagai tetua persilangan karena memiliki jarak genetik yang dekat. Sementara itu aksesori dengan nilai kesamaan genetik terendah ditunjukkan oleh aksesori Tibuang Cahdi C asal Jeneponto Sulawesi Selatan dan Lokal Bima 2A asal Bima Nusa Tenggara Barat dengan nilai similaritas sebesar 83%. Kedua aksesori tersebut potensial untuk digunakan sebagai tetua persilangan karena memiliki jarak genetik yang cukup jauh. Analisis tingkat polimorfisme menunjukkan bahwa kesepuluh marka SSR kacang hijau yang digunakan pada penelitian ini memiliki tingkat informativitas tinggi (PIC >0,7) sehingga dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik aksesori kacang hijau lain ke depannya ataupun sebagai alat bantu seleksi pada kegiatan persilangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Dr. Nurwita Dewi yang telah membantu menyiapkan materi genetik untuk kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anumalla, M., R. Roychowdhury, C.K. Geda, M. Mazid and A.K. Rathoure. 2015. Utilization of plant genetic resources and diversity analysis tools for sustainable crop improvement with special emphasis on rice. *International Journal of Advanced Research* 3(3): 1155-1175.
- Arsyadmunir, A. 2016. Periode kritis kekeringan pada pertumbuhan dan produksi kacang hijau (*Vigna radiata* L.). *Agrovigor* 9(2): 132-140.
- Asadi, P. Lestari, dan N. Dewi. 2016. Prapemuliaan aneka kacang dalam mendukung proses pemuliaan untuk perakitan varietas unggul baru. *Jurnal AgroBiogen* 12(1): 51-62.
- Barus, W.A., H. Khair dan M.A. Siregar. 2014. Respon pertumbuhan dan produksi kacang hijau (*Phaseolus radiatus* L.) akibat penggunaan pupuk organik cair dan pupuk TSP. *Agrium* 19 (1): 1-11.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of genetik linkage map in human using restriction fragmen length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314- 331.
- Chen, H., L. Qiao, L. Wang, S. Wang, M.W. Blair and X. Cheng. 2015.

- Assessment of genetic diversity and population structure of mung bean (*Vigna radiata*) germplasm using EST-based and genomic SSR markers. *Gene* 566(2): 175-183.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13–15.
- Gupta, S.K., R. Bansal and T. Gopalakrishna. 2014. Development and characterization of genic SSR markers for mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica* 195: 245–258.
- Gusmiaty, M. Restu, Asrianny dan S.H. Larekeng. 2016. Polimorfisme penanda RAPD untuk analisis keragaman genetik *Pinus merkusii* di Hutan Pendidikan Unhas. *Jurnal Natur Indonesia* 16(2): 47-53.
- Kementrian Pertanian. 2018. Statistik Pertanian 2018. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Kementrian Pertanian Republik Indonesia.
- Kementrian Pertanian. 2020. Laporan Tahunan Direktorat Aneka Kacang dan Umbi. Jakarta: Kementrian Pertanian, Direktorat Jenderal Tanaman Pangan, Direktorat Aneka Kacang dan Umbi.
- Lestari, P., S.K. Kim, Reflinur, Y.J. Kang, N. Dewi and S.H. Lee. 2014. Genetic diversity of mungbean (*Vigna radiata* L.) germplasm in Indonesia. *Plant Genetic Resources* 12: S91-S94.
- Liu, K and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: An Integrated Analysis Environment for Genetic Marker Analysis. Raleigh: Bioinformatics Research Center, North Carolina State University.
- Malik, R.H., A.R. Khan, K. Aslam, G. Shabir, A. Nazir and S.H. Shah. 2019. Evaluation of sequence related amplified polymorphic markers for genetic characterization of *Mentha* species. *Philippine Journal of Crop Science* 44(2): 71-76.
- Pagnotta, M.A. 2018. Comparison among methods and statistical software packages to analyze germplasm genetic diversity by means of codominant markers. *Multidisciplinary Scientific Journal* 1: 197-215.
- Pangestika, Y., A. Budiharjo dan H.P. Kusumaningrum. 2015. Analisis filogenetik *Curcuma zedoaria* (temu putih) berdasarkan gen *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *Jurnal Biologi* 4(4): 8-13.
- Polnaya, F. dan J.E. Patty. 2012. Kajian pertumbuhan dan produksi varietas jagung lokal dan kacang hijau dalam sistem tumpangsari. *Agrologia* 1(1): 42-50.
- Ratnasari, D., Y.D. Rahmawati, H. Fajarini dan D. Nafisyah. 2021. Potensi kacang hijau sebagai makanan alternatif penyakit degeneratif. *Jurnal Abdi Masyarakat UMUS* 1(2): 90-96.
- Reflinur, P. Lestari and S.H. Lee. 2017. The potential use of SSR markers to support the morphological identification of Indonesian mungbean varieties. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 17(2): 65-74.
- Ritonga, N.J., E.D. Mulyani, D.E. Anuhgera, Damayanti, R. Sitorus dan W.W. Siregar. 2019. Sari kacang hijau sebagai alternatif meningkatkan produksi air susu ibu (ASI) pada ibu menyusui. *Jurnal Keperawatan dan Fisioterapi* 2(1): 89-94.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem. Version: 2.1. New York: Exeter Software.
- Santoso, T.J., D.W. Utami dan E.M. Septiningsih. 2006. Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal AgroBiogen* 2(1): 1-7.

- Sharma, S., H.D. Upahyaya, R.K. Varshney and C.L.L. Gowda. 2013. Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Frontiers in Plant Science* 4: 309.
- Shrivastava, D., P. Verma and S. Bhatia. 2014. Expanding the repertoire of microsatellite markers for polymorphism studies in Indian accessions of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Molecular Biology Reports* 41(9): 5669-5680.
- Trustinah, B.S. Radjit, N. Prasetiaswati dan D. Harnowo. 2014. Adopsi varietas unggul kacang hijau di sentra produksi. *Iptek Tanaman Pangan* 9(1): 24-38.
- Wang, L., P. Bai, X. Yuan, H. Chen, S. Wang, X. Chen and X. Cheng. 2018. Genetic diversity assessment of a set of introduced mung bean accessions (*Vigna radiata* L.). *The Crop Journal* 6(2): 207-213.
- Yono, D., Y. Wahyu, Sobir dan N. Toruan-Mathius. 2017. Identifikasi penanda SSR yang berasosiasi dengan bobot tandan buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agronomi Indonesia* 45(1): 79-85.
- Yoon, M.Y., K.T. Moe, D.Y. Kim, I.R. Rho, S. Kim, K.T. Kim, M.K. Won, J.W. Chung and Y.J. Park. 2012. Genetic diversity and population structure analysis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology* 5(2): 1-16.
- Yuliasti and Reflinur. 2015. Evaluation of mungbean mutant lines to drought stress and their genetic relationships using SSR markers. *Atom Indonesia* 41(3): 161-167.