

APLIKASI MARKA MOLEKULER PADA BUAH DAN BIJI KOPI ASAL KALIMANTAN TIMUR*

[Molecular marker application of cherry and green bean of East Kalimantan coffee]

Fatimah^{1✉}, Urnemi², Apon Zaenal Mustopa³, Hudaida Syahrumsyah²

¹Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

²Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman. Gunung Kelua Jl. Pasir Balengkong

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl Raya Bogor Km 46. Cibinong
email: fathyapril@yahoo.com

ABSTRACT

Two quantitative traits, cherry and green bean characters are the important phenotypic selection in coffee breeding practice. The important well-known character from coffee markets is cherry and bean size. In this study, 43 genotypes of coffee were collected from four districts in East Kalimantan *i.e.* Kutai Kertanegara, Kutai Timur, Berau dan Paser Utara. The objective of this study was to identify cherry and green bean character using quantitative trait locus (QTL) molecular marker, genetic variation from developed alleles, cluster analysis and association analysis of molecular marker, and phenotype observation. Based on polymorphic information content (PIC) of primers used in this study, the genetic variation was low. Based on cluster analysis, two major groups were identified. The first group corresponds to Arabika that consisted of 3 districts, Kutai Timur, Berau and Paser Utara. The second group correspond to Robusta mostly from Kutai Kertanegara. Significant association of primer markers M480 and M312 with QTL has suggested that they can be used as specific primers linked to size of cherry and green bean. Furthermore, they were potential marker assisted breeding in coffee breeding program.

Key words: microsatellite marker, EST marker, size, cherry, green bean

ABSTRAK

Sifat kuantitatif pada buah dan biji kopi memegang peranan penting dalam seleksi fenotip pada pemuliaan kopi. Salah satu karakter yang dicari pasar adalah ukuran buah dan biji kopi. Pada penelitian ini, 43 genotipe kopi dikoleksi dari empat kabupaten di Kalimantan Timur yaitu Kabupaten Kutai Kertanegara, Kutai Timur, Berau dan Paser Utara. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakter buah dan biji kopi dengan menggunakan marka molekuler pada daerah QTL dan marka fenologi, melihat variasi genetik dari alel yang dihasilkan kopi Kalimantan Timur, analisis cluster, dan menganalisis asosiasi marka tersebut dengan karakter berdasarkan observasi fenotip. Penelitian ini menggunakan 6 primer mikrosatelit dan 4 primer EST berdasarkan QTL terpilih. Berdasarkan nilai polymorphic information content (PIC) dari marka molekuler yang digunakan, diperoleh variasi genetik yang rendah pada kopi Kalimantan Timur. Sedangkan dari hasil analisis pengelompokan teridentifikasi dua grup yang terdiri atas grup Arabika yang berasal dari Kabupaten Kutai Timur, Berau dan Paser Utara dan grup Robusta yang sebagian besar berasal dari Kutai Kertanegara. Terdapat asosiasi yang signifikan dari primer M480 dan M312 dengan QTL sehingga marka ini dapat digunakan sebagai primer spesifik terkait ukuran buah dan biji kopi yang potensial dalam seleksi berbantu marka dalam program pemuliaan kopi.

Kata kunci: Marka mikrosatelit, marka EST, ukuran, berat, buah kopi, biji kopi

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara penghasil kopi terbesar ke-3 dunia setelah Brazil dan Vietnam. Perkebunan kopi di Indonesia tersebar di pulau-pulau besar di Indonesia, seperti Sumatera (63%), Jawa (14%), Nusa Tenggara (9%), Sulawesi (10%) dan Maluku, Papua (1%). Indonesia menghasilkan berbagai varietas kopi arabika dan kopi robusta. Beberapa varietas tersebut adalah kopi Arabika tipe Abesinia, Arabika tipe Pasumah, Arabika tipe Marago, Arabika tipe Typica dan Arabika tipe Congensis. Sedangkan untuk kopi arabika *specialty* ada beberapa varietas, seperti Mandailing dan *Lintong Coffee* di Sumatera Utara, *Gayo Mountain Coffee* di Aceh, *Java Arabica Coffee* di Jawa Timur, *Kin-*

tamani Coffee di Bali, *Kalosi Coffee* di Sulawesi Selatan, *Flores-Bajawa Coffee* di Nusa Tenggara Timur, *Baliem Coffee* di Papua, dan *Luwak Coffee* di Jawa (DJPPHP, 2013).

Berdasarkan data statistik tahun 2011 luas areal tanaman kopi Kalimantan tercatat seluas 10.586 Ha dengan produksi 2.312 ton. Produksi biji kering seluruhnya dipasarkan untuk kebutuhan konsumsi dalam daerah (Dinas Perkebunan Provinsi Kalimantan Timur, 2013). Hampir keseluruhan perkebunan kopi di Kalimantan Timur ditanami jenis Robusta seperti Kabupaten Pasir, Penajam Paser Utara, Kutai Timur, Kutai Barat, Malinau, Nunukan dan sebagian Kutai Kertanegara ditanami Robusta dan Arabika (Panggabean, 2011). Kopi Robusta Kalimantan Ti-

mur memiliki keunggulan komparatif dan keunggulan kompetitif dan mampu membiayai sistem produksi kopi lebih murah dibandingkan jika mengimpor kopi (Desianti, 2002).

Permasalahan yang dihadapi umumnya adalah pada fase pemetikan dan penanganan pasca panen. Petani memetik buah kopi sebelum usia panen (petik hijau) sehingga menghasilkan kopi mutu rendah. Tingkat kematangan buah kopi yang seragam merupakan kriteria yang penting dalam menyeleksi kopi. Selain itu, besar biji yang berbeda antara satu dengan yang lainnya memerlukan waktu lebih untuk sortasi sehingga mempengaruhi efisiensi pengolahan serta mutu produk.

Harga biji kopi secara signifikan terkait dengan ukuran biji kopi, semakin besar ukuran biji kopi maka akan semakin mahal harganya. Ukuran biji secara genetik sudah ditentukan namun dapat terpengaruh kondisi lingkungan (Vaast *et al.*, 2006). Standar kualitas biji kopi lainnya adalah berat biji kopi yang merepresentasikan densitas biji kopi. Beberapa studi menunjukkan bahwa adanya hubungan langsung antara berat biji kopi dengan kualitas kopi (Sivetz, 1979).

Pada program pemuliaan kopi, sifat kuantitatif pada buah dan biji kopi memegang peranan penting dalam seleksi fenotip. Kematangan buah, ukuran, berat dan bentuk dari biji kopi merupakan sifat yang diinginkan dalam program pemuliaan. Saat ini telah dilakukan beberapa studi QTL, antara lain yang mengontrol waktu pematangan (Akaffou *et al.*, 2003), sifat morfologi (Diaye *et al.*, 2007), hasil (Leroy *et al.*, 2011) dan kematangan buah dan biji kopi (Priyono dan Sumirat, 2012). Selain itu sudah ada teknik pemetaan protein secara dua dimensi yang digunakan untuk membedakan sampel biji kopi (Gil *et al.*, 2005).

Penggunaan marka molekuler berdasarkan *expressed sequence tag* (EST) yang terkait dengan perkembangan buah dan proses pematangan yang selanjutnya disebut marka fenologi buah kopi. Gen *α-galactosidase* digunakan sebagai marka terkait tahap perkembangan awal buah (*green stage*) yaitu marka GAL, gen *caffeine synthase* sebagai marka

transisi dari tahap perkembangan *green* ke tahap *yellowish-green* yaitu (CS), dan gen *isocitrate lyase* (ICL) dan *ethylene receptor 3* (ETR) sebagai marka pada pematangan lanjut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi karakter buah dan biji kopi dengan menggunakan marka molekuler dan marka fenologi, melihat variasi genetik dari alel yang dihasilkan kopi Kalimantan Timur dan menganalisis asosiasi marka tersebut dengan karakter buah dan biji kopi berdasarkan observasi fenotip.

BAHAN DAN CARA KERJA

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tahun 2013. Tanaman kopi dikoleksi dari empat kabupaten di Kalimantan Timur dan observasi fenotip dilakukan di Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur. Analisis molekuler dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler di Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen) Bogor.

Bahan

Bahan tanaman yang digunakan adalah 43 genotipe kopi yang terdiri atas kopi Arabika dan Robusta (Tabel 1) dan berasal dari empat lokasi di Kalimantan Timur yaitu Kabupaten Kutai Kertanegara (KUKAR) yang berada di dataran rendah, dan tiga lokasi yang berada di dataran tinggi yaitu Kabupaten Kutai Timur (KUTIM), Kabupaten Berau dan Paser Utara (Gambar 1).

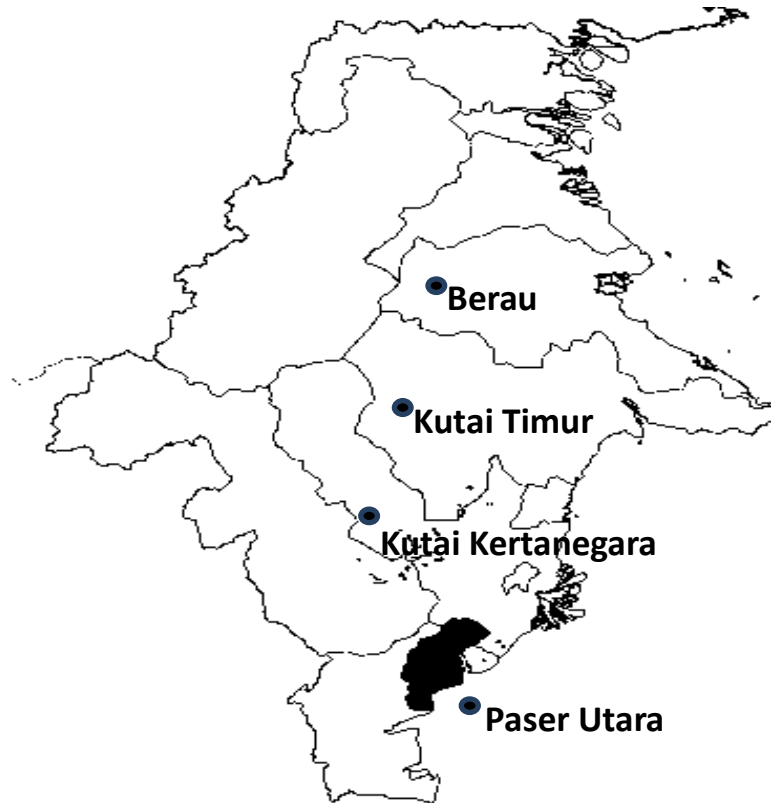
Analisis molekuler dilakukan dengan menggunakan marka mikrosatelit berdasarkan QTL yang terkait dengan kematangan buah kopi yaitu ukuran dan berat buah dan biji kopi (Priyono and Sumirat, 2012) dan marka molekuler berdasarkan *expressed sequence tag* (EST) yang terkait dengan perkembangan buah dan proses pematangan yang selanjutnya disebut marka fenologi (Pazzopane *et al.*, 2012). Penelitian ini menggunakan enam primer mikrosatelit dan empat primer EST (Tabel 2).

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Rogers dan Bendich (1985). Untuk melihat

Tabel 1. Daftar tanaman kopi yang telah dikoleksi dalam penelitian ini (*List of collected coffee in this research*)

| No. (No.) | Kode (Code) | Desa (Village) | Kecamatan (Sub-District) | Kabupaten (District) | Jenis Kopi (Type of Coffee) |
|-----------|-------------|----------------|--------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | A1 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 2 | A2 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 3 | A4 | Tanjung Santan | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 4 | A5 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 5 | A6 | Tanjung Santan | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 6 | A7 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 7 | A8 | Tanjung Santan | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 8 | A9 | Tanjung Santan | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 9 | A10 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 10 | A11 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 11 | A12 | Santan Ilir | Marangkayu | KUKAR | Robusta |
| 12 | B1 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Arabica |
| 13 | B2 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Robusta |
| 14 | B5 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Robusta |
| 15 | B7 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Arabica |
| 16 | B8 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Arabica |
| 17 | B9 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Arabica |
| 18 | B11 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Robusta |
| 19 | B12 | Kandolo | Teluk Pandan | KUTIM | Robusta |
| 20 | C1 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 21 | C2 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 22 | C3 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 23 | C4 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 24 | C5 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 25 | C6 | Tumaring | Talisayan | Berau | Robusta |
| 26 | C7 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 27 | C8 | Tumaring | Talisayan | Berau | Robusta |
| 28 | C9 | Tumaring | Talisayan | Berau | Robusta |
| 29 | C10 | Tumaring | Talisayan | Berau | Robusta |
| 30 | C11 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 31 | C12 | Tumaring | Talisayan | Berau | Arabica |
| 32 | D1 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 33 | D2 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 34 | D3 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 35 | D4 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Arabica |
| 36 | D5 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 37 | D6 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 38 | D7 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 39 | D8 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 40 | D9 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Arabica |
| 41 | D10 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 42 | D11 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |
| 43 | D12 | Suka Raja | Sepaku | Paser Utara | Robusta |



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel daun kopi di empat kabupaten Provinsi Kalimantan Timur (*Location of collected coffee leaves from four districts in East Kalimantan Province*).

Tabel 2. Daftar primer mikrosatelit dan EST kopi yang digunakan dalam penelitian ini (*List of microsatellite primers and coffee ESTs used in this study*)

| No | Primer (Primer) | Sekuen (Sequence) | Motif (Motifs) | Produk (Product) bp |
|----|-------------------|--|----------------|---------------------|
| 1 | M428 ^a | F-GGGCACCAAAGAAAGTGG R-GATGTGAAATGCAAGCAGGA | (AC)9 | 231 |
| 2 | M329 ^a | F-ACTCAGACAAACCCTTCAAC R-GATGTTTTGCATCTATTTGG | (GT)10 | 235 |
| 3 | M363 ^a | F-GCATCTTCGTCTTCTTTGG R-GAAACGGGCCACTTGA | (AT)6(AC)7 | 131 |
| 4 | M358 ^a | F-CATGCACTATTATGTTTGTGTTTT R-TCTCGTCATATTTACAGGTAGGTT | (CA)11 | 248 |
| 5 | M312 ^a | F-TTGCGTAAAGAGAACGAGCA R-GTGTGGAAAATTCACCTGAGC | (TG)9 | 106 |
| 6 | M480 ^a | F-GTCAGAGGCAACTGTAGGTTAATG R-CCAAATCCACTATTTCTTGGTTG | (AC)19 | 196 |
| 7 | CS ^b | F-GCCGAATGTCCTTACTTTT R-CAGGATACAGGGGAATGGGATC | EST | 300 |
| 8 | ICL ^b | F-GGCACAGCATCAAGAACCT R-ATCCAGTATCGCCATCAGC | EST | 300 |
| 9 | ETR ^b | F-GAGATGGTCCCTGCATGTTA R-TTGCTCGTCTTGACCATAGC | EST | 370 |
| 10 | GAL ^b | F-CAGGAACCGAGGATTACA R-AGTTCTGCCCAACAGTCA | EST | 200 |

Sumber (source): ^aCirad-IRD-Priyono *et al.*, 2012

^bPezzopane *et al.*, 2012

kualitas DNA menggunakan 0,8% gel agarosa dan pewarnaan dengan etidium bromida. Gel agarosa yang telah selesai dielektroforasi kemudian divisualisasi dengan Chemidoc UV-Illuminator (Biorad).

Amplifikasi PCR

Amplifikasi sampel DNA hasil isolasi dari tanaman kopi menggunakan mesin PCR Biometra. Reaksi PCR mengandung 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 100 ng DNA genomik, 10 pmol untuk setiap primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM untuk setiap dNTP, dan 0.2 units DNA Taq polymerase (Fermentas). Program PCR terdiri atas tahapan: pre-denaturasi pada 94 °C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan 35 siklus yang masing-masing siklus terdiri atas: tahapan denaturasi pada suhu 94 °C selama 45 detik, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 45 detik, dan pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 1 menit 45 detik. Reaksi amplifikasi ini diakhiri dengan pemanjangan primer pada suhu 72 °C selama 10 menit. Produk PCR dielektroforasi pada 8% gel akrilamida, dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan pewarna *silver staining*. Gel hasil elektroforesis produk PCR divisualisasi dengan Chemidoc UV-Illuminator (Biorad).

Analisis data

Data yang diperoleh berupa pita-pita DNA yang dihasilkan dari amplifikasi PCR dianalisis

dengan menggunakan *software* Power Marker versi 3.25 (Liu dan Muse, 2004) untuk (i) mengkalkulasi variasi genetik berupa nilai *Polymorphic Information Content* (PIC), (ii) konstruksi dendrogram dengan metode UPGMA dengan menggunakan jarak genetik Nei 1973. Analisis gabungan (*association analysis*) menggunakan program Tassel V3.0 (Bradbury *et al.*, 2007).

Observasi Fenotip

Observasi dilakukan pada parameter ukuran buah kopi dan panjang dan berat biji kopi dengan mengukur tiga karakter buah kopi yaitu panjang, lebar dan ketebalan buah kopi yang matang sempurna pada setiap genotipe, mengukur panjang biji kopi dan menimbang berat 100 biji kopi.

HASIL

Variasi Marka Molekuler

Hasil analisis 43 genotipe kopi menggunakan 6 primer SSR dan 4 primer EST mendeteksi adanya 21 alel, dimana jumlah alel per lokus 2-3 alel, nilai rata-rata frekuensi alel adalah 0,74, nilai rata-rata parameter genetik yaitu *gene diversity* (He) sebesar 0,343, heterosigositas (Ho) sebesar 0,361 dan PIC sebesar 0,27 (Tabel 3).

Dari 6 primer mikrosatelit yang digunakan dihasilkan jumlah alel sebanyak 2 alel. Nilai *gene*

Tabel 3. Hasil analisis keragaman genetik menggunakan 6 primer SSR dan 4 primer EST kopi (*Genetic diversity analysis using 6 SSR primers and 4 EST primers*)

| Primer (Primer) | Frekuensi Alel (Frequency of alleles) | Parameter Genetik (<i>Genetic parameter</i>) | | |
|---------------------|--|--|---|--------|
| | | <i>Gene Diversity</i> (He) | Heterozigositas (<i>Heterozygosity</i>) (Ho) | PIC |
| M428 | 0,9500 | 0,0950 | 0,1000 | 0,0905 |
| M329 | 0,5625 | 0,4922 | 0,3750 | 0,3711 |
| M363 | 0,6410 | 0,4602 | 0,3590 | 0,3543 |
| M358 | 0,6000 | 0,4800 | 0,8000 | 0,3648 |
| M312 | 0,7125 | 0,4097 | 0,5250 | 0,3258 |
| M480 | 0,8108 | 0,3068 | 0,3784 | 0,2597 |
| CS | 0,7727 | 0,3512 | 0,4545 | 0,2896 |
| ICL | 0,8378 | 0,2717 | 0,2703 | 0,2348 |
| ETR | 0,9231 | 0,1437 | 0,1538 | 0,1364 |
| GAL | 0,7000 | 0,4200 | 0,2000 | 0,3318 |
| Rerata (Average) | 0,7510 | 0,3431 | 0,3616 | 0,2759 |

diversity (He) dan PIC yang paling tinggi adalah M329 yaitu berturut-turut 0,49 dan 0,37 sedangkan nilai yang paling rendah adalah primer M428 yaitu berturut-turut 0,095 dan 0,090. Dari 4 primer EST yang digunakan dihasilkan jumlah alel sebanyak 2-3 alel. Nilai *gene diversity* (He) dan PIC yang paling tinggi adalah GAL yaitu berturut-turut 0,42 dan 0,33 sedangkan nilai yang paling rendah adalah primer ETR yaitu berturut-turut 0,14 dan 0,13.

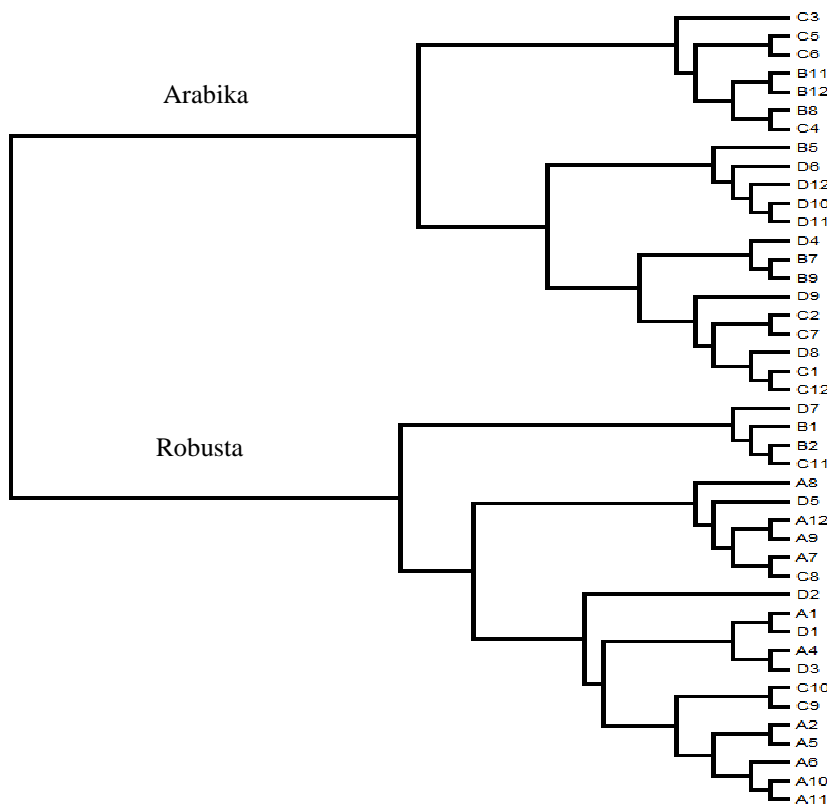
Analisis pengelompokan (Cluster Analysis)

Analisis pengelompokan menggunakan delapan primer karena dua primer yaitu primer M428 dan ETR memiliki nilai PIC yang rendah berturut-turut 0,09 dan 0,13 sehingga tidak digunakan dalam mengkonstruksi dendrogram. Hasil analisis pengelompokan (Gambar 2) memperlihatkan 2 kelompok

besar. Kelompok pertama terdiri atas genotipe kopi Arabika dan kelompok kedua genotipe kopi Robusta.

Observasi Fenotip

Genotipe B1, B7, B8, B9, C1, C2, C12, dan D9 memiliki ukuran buah dan biji kopi yang lebih besar dengan ukuran buah kopi berturut-turut panjang/lebar/tebal yaitu 23 mm, 20 mm dan 20 mm sedangkan panjang dan berat biji kopi berturut-turut yaitu 12 mm dan 35 mg (Tabel 4) dan termasuk jenis genotipe kopi Arabika. Genotipe A1, A7, A11, A12, B2, B12, C10, D1, D7 dan D12 memiliki ukuran buah dan biji kopi yang lebih kecil dengan ukuran buah kopi berturut-turut panjang/lebar/tebal yaitu 15 mm, 12 mm dan 8 mm sedangkan panjang dan berat biji kopi berturut-turut yaitu 7 mm dan 15 mg dan termasuk jenis genotipe kopi Robusta (Tabel 4).



Gambar 2. Dendrogram UPGMA yang menggambarkan pengelompokan 43 genotipe kopi asal empat kabupaten di Kalimantan Timur (UPGMA Dendrogram described the grouping of 43 genotypes of coffee originated from four district in East Kalimantan)

Tabel 4. Hasil observasi fenotip pada buah dan biji 43 genotipe kopi asal Kalimantan Timur (*Phenotype observation on Cherry and bean of 43 genotypes of coffee originated from East Kalimantan*)

| No (No) | Kode (Code) | Ukuran buah Kopi Panjang/ Lebar/Tebal (Cherry Size Length/Width/ Thickness) (mm) | Panjang Biji Kopi (Bean Length) (mm) | Berat 100 Biji Kopi (100 bean weight) (mg) | No (No). | Kode (Code) | Ukuran buah Kopi Panjang/ Lebar/Tebal (Cherry Size Length/Width/ Thickness) (mm) | Panjang Biji Kopi (Bean Length) (mm) | Berat 100 Biji Kopi (100 bean weight) (mg) |
|------------|----------------|--|--|--|-------------|----------------|--|--|--|
| 1 | A1 | 15/12/8 | 7 | 15 | 23 | C4 | 22/20/18 | 11 | 30 |
| 2 | A2 | 16/13/9 | 8 | 17 | 24 | C5 | 21/19/16 | 10,5 | 25 |
| 3 | A4 | 18/16/10 | 9 | 20 | 25 | C6 | 18/16/10 | 9 | 20 |
| 4 | A5 | 17/14/9 | 8,5 | 18 | 26 | C7 | 20/19/15 | 10 | 20 |
| 5 | A6 | 16/13/9 | 8 | 17 | 27 | C8 | 17/14/9 | 8,5 | 18 |
| 6 | A7 | 15/12/8 | 7 | 15 | 28 | C9 | 16/13/9 | 8 | 17 |
| 7 | A8 | 18/16/10 | 9 | 20 | 29 | C10 | 15/12/8 | 7 | 15 |
| 8 | A9 | 15/12/8 | 7 | 15 | 30 | C11 | 21/19/16 | 10,5 | 25 |
| 9 | A10 | 16/13/9 | 8 | 17 | 31 | C12 | 22/20/18 | 11 | 30 |
| 10 | A11 | 15/12/8 | 7 | 15 | 32 | D1 | 15/12/8 | 7 | 15 |
| 11 | A12 | 16/13/9 | 8 | 17 | 33 | D2 | 17/14/9 | 8,5 | 18 |
| 12 | B1 | 23/20/20 | 12 | 35 | 34 | D3 | 18/16/10 | 9 | 20 |
| 13 | B2 | 15/12/8 | 7 | 15 | 35 | D4 | 20/19/15 | 10 | 20 |
| 14 | B5 | 17/14/9 | 8,5 | 18 | 36 | D5 | 16/13/9 | 8 | 17 |
| 15 | B7 | 23/20/20 | 12 | 35 | 37 | D6 | 16/13/9 | 8 | 17 |
| 16 | B8 | 23/20/20 | 12 | 35 | 38 | D7 | 15/12/8 | 7 | 15 |
| 17 | B9 | 23/20/20 | 12 | 35 | 39 | D8 | 17/14/9 | 8,5 | 18 |
| 18 | B11 | 18/16/10 | 9 | 20 | 40 | D9 | 23/20/20 | 12 | 35 |
| 19 | B12 | 15/12/8 | 7 | 15 | 41 | D10 | 18/16/10 | 9 | 20 |
| 20 | C1 | 23/20/20 | 12 | 35 | 42 | D11 | 16/13/9 | 8 | 17 |
| 21 | C2 | 23/20/20 | 12 | 35 | 43 | D12 | 15/12/8 | 7 | 15 |
| 22 | C3 | 20/19/15 | 10 | 20 | | | | | |

Asosiasi marka molekuler pada sifat buah dan biji kopi

Hasil amplifikasi PCR pada genotipe B1, B7, B8, B9, D9, C12, C1, C2 dengan menggunakan primer M480 memiliki dua pita yaitu pada ukuran 196 pb dan 250 pb dan pada primer M312 dengan ukuran pita 106 pb dan 150 pb. Pola pita ini berbeda jika dibandingkan dengan genotipe lainnya yang hanya memiliki satu pita yaitu pada 196 pb dan 106 pb saja. M480 merupakan primer yang terkait dengan ukuran biji kopi normal sedangkan M312

terkait dengan ukuran biji yang berukuran lebih besar.

Analisis asosiasi menggunakan *General Linear Model* (Tabel 5) telah mengidentifikasi asosiasi marka dan karakter ($P < 0.0001$) yang signifikan pada buah dan ukuran biji kopi. Primer M480 dan M312 berasosiasi nyata dengan panjang, lebar dan tebal buah kopi, panjang dan berat biji kopi (Tabel 5). Primer lain yang terkait panjang buah kopi adalah primer M428, M329 dan M358, namun ketiga primer tersebut memiliki asosiasi yang tidak signifikan.

Tabel 5. Analisis asosiasi primer dan karakter pada kopi Kalimantan Timur (*Association analysis between primer and character of East Kalimantan coffee*).

| Karakter yang diamati (<i>Observed characters</i>) | Primer (<i>Primer</i>) ^a | P | R ^{2b} |
|---|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Berat biji (<i>Bean weight</i>) | M480 | 6,26x10 ⁻⁷ | 0.523 |
| | M312 | 5,41x10 ⁻⁵ | 0.420 |
| Lebar buah (<i>Cherry Width</i>) | M480 | 1,11x10 ⁻⁸ | 0.622 |
| | M312 | 1,46x10 ⁻⁵ | 0.461 |
| Panjang buah (<i>Cherry Length</i>) | M480 | 3,71x10 ⁻⁸ | 0,594 |
| | M312 | 2,19x10 ⁻⁵ | 0,449 |
| Tebal buah (<i>Cherry Thickness</i>) | M480 | 6,18x10 ⁻⁸ | 0.582 |
| | M312 | 2,16x10 ⁻⁵ | 0.449 |
| Panjang biji (<i>Bean Length</i>) | M480 | 4,73x10 ⁻⁹ | 0.640 |
| | M312 | 8,36x10 ⁻⁶ | 0.477 |

^aHanya primer yang memiliki asosiasi signifikan (*Only primers with significant association*) (P<0.001)

^bR² mengindikasikan persentase total variasi (*indicated percentage of total variation*)

PEMBAHASAN

Analisis keragaman genetik pada 43 genotipe kopi asal empat kabupaten di Kalimantan Timur dengan menggunakan 6 marka mikrosatelit dan 4 marka EST menunjukkan nilai heterosigositas dan keragaman genetik yang rendah dan berkorelasi positif dengan nilai PIC yang rendah. Hal ini mengindikasikan rendahnya tingkat polimorfisme pada marka yang digunakan. PIC merupakan parameter untuk menentukan tingkat keragaman alel di dalam populasi tanaman. Nilai polimorfisme yang rendah juga dilaporkan oleh Baruah *et al.* (2003) dan Geleta *et al.* (2012) yang menyatakan adanya sifat autogami yang alami dan sempitnya basis genetik pada spesies *C. arabica*. Nilai polimorfisme yang tinggi juga ditemukan pada kelompok Robusta yang dilaporkan pada studi terdahulu (Poncet *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2007; Hendre *et al.*, 2008; Missio *et al.*, 2011). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh allogami dan *background* tetua yang beragam.

Analisis pengelompokan 43 genotipe kopi Kalimantan Timur memperlihatkan 2 grup besar yaitu grup kopi Arabika sebesar 49% (21/43) dan kopi Robusta sebesar 51% (22/43). Grup pertama berasal dari tiga lokasi yang berada di dataran tinggi yaitu

Kabupaten Kutai Timur, Kabupaten Berau dan Paser Utara. Grup kedua berasal dari Kabupaten Kutai Kertanegara yang berada di dataran rendah sebanyak 91% (20/22) dan 9% (2/22) dari tiga lokasi di dataran tinggi. Primer-primer yang digunakan dalam studi ini mampu mengidentifikasi 43 genotipe kopi Kalimantan Timur ke dalam jenis kopi Arabika dan Robusta.

Analisis asosiasi buah dan biji kopi Kalimantan Timur didapatkan primer M480 dan M312 berasosiasi nyata dengan panjang, lebar dan tebal buah kopi, panjang dan berat biji kopi. Priyono dan Sumirat (2012) melaporkan bahwa panjang, lebar dan tebal buah kopi berkorelasi positif dengan biji kopi berukuran ekstra besar. QTL terkait sifat ukuran buah kopi (lebar dan tebal buah kopi) dan ukuran biji kopi (biji ekstra besar) adalah berada dalam satu daerah genom, yaitu *linkage group* K atau bisa dipertimbangkan sebagai *Single QTL*.

Pada penelitian ini marka EST digunakan untuk mendeteksi genotipe terkait dengan gen perkembangan buah dan proses pematangan. Primer CS dan GAL yang terkait dengan awal perkembangan buah dan biji (*green stage*) ternyata menghasilkan pita-pita yang kurang informatif (data tidak ditampilkan). Menurut Pazzopane *et al.*, (2012)

primer ETR (*ethylene reseptor*) dan primer ICL (*Isocitrate lyase*) merupakan primer yang terkait dengan saat kematangan akhir pada buah kopi. Primer ETR dan ICL berhasil mengamplifikasi dan didapatkan pola pita yang sama dari genotipe-genotipe kopi yang dievaluasi pada kedua primer tersebut. Namun pada studi ini tidak dilakukan analisis transkripsi gen dan profil ekspresi buah kopi pada gen *reseptor etilen3* (ETR) dan *isocitrate lyase* (ICL) sehingga tingkat kematangan buah kopi berdasarkan karakter tersebut belum dapat dikaitkan dengan marka EST pada genotipe kopi yang dievaluasi.

Primer mikrosatelit yang digunakan dalam studi ini merupakan primer yang dikembangkan dari kopi Robusta (Priyono dan Ucu, 2012) dan primer EST yang digunakan dikembangkan dari kopi Arabika (Pazzopane *et al.*, 2012). Genotipe kopi dalam penelitian ini terdiri dari jenis kopi Arabika dan Robusta. Hal ini menunjukkan kemampuan primer-primer tersebut untuk diaplikasikan pada spesies kopi yang berdekatan atau disebut juga *cross-species/generic transferability* (Baruah *et al.*, 2003; Poncet *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005; Aggarwal *et al.*, 2007; Hendre *et al.*, 2008; Priyono *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini diperoleh level genetik yang rendah pada 43 genotipe kopi Kalimantan Timur berdasarkan 6 marka mikrosatelit dan 4 marka EST dan teridentifikasi dua grup yang terdiri dari grup Arabika berasal dari Kabupaten Kutai Timur, Kabupaten Berau dan Paser Utara dan grup Robusta yang sebagian besar berasal dari Kutai Kertanegara. Terdapat asosiasi yang signifikan pada primer M480 dan M312 sehingga dapat digunakan sebagai primer spesifik terkait panjang, lebar dan tebal buah kopi, panjang dan berat biji kopi. Potensi marka molekuler yang digunakan dalam studi ini mampu membedakan secara jelas genotipe kopi dan asal ekogeografi yang berbeda sehingga dapat digunakan dalam mengontrol kualitas kopi (*DNA-based traceability*) dan informasi ini dapat memfasilitasi pemuliaan kopi secara efektif

terkait ukuran buah dan biji kopi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek KKP3N Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian Tahun 2013. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Muslihatun Baroya, Arin Cintia Permata dan Hermanto yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal RK, PS Hendre, RK Varshney, PR Bhat, V Krishnakumar, and L Singh. 2007. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theoretical Applied Genetic*. **114**, 359-372.
- Akaffou DS, CL Ky, P Barre, S Hamon, J Louarn, M Noirof. 2003. Identification and mapping of a major gene (F1t) involved in fructification time in interspecific cross *Coffea pseudozanguebariae* X *C. liberica* var Dew: Impact on caffeine content and seed weight. *Theoretical Applied Genetic* **108**, 1486-1490.
- Baruah A, V Naik, PS Hendre, R Rajkumar, P Rajendrakumar and RK Aggarwal. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite markers from *Coffea arabica* (L.) showing wide cross-species amplifications. *Molecular Ecology Notes* **3**, 647-650.
- Bhat PR, V Krishnakumar, PS Hendre, P Rajendrakumar, RK Varshney and RK Aggarwal. 2005. Identification and characterization of expressed sequence tags-derived simple sequence repeats markers from robusta coffee variety 'CXR' (an interspecific hybrid of *Coffea canephora* & *Coffea congensis*). *Molecular Ecology Notes* **5**, 80-83.
- Bradbury PJ *et al.* 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**, 2633-2635.
- Desianti LC. 2002. Dampak Kebijakan Pemerintah Terhadap Profitabilitas dan Daya saing Kopi Robusta Indonesia. Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor. [Tesis]
- Dinas Perkebunan Provinsi Kalimantan Timur, 2013. Komoditi Kopi <http://disbun.kaltimprov.go.id/statis-42-komoditi-kopi.html>.(diunduh tanggal 25 Juni 2014).
- Diaye AN, M Noirof, S Hamon, V Poncet. 2007. Genetic basis of species differentiation between *Coffea liberica* and *C. canephora*: Analysis of an interspecific cross. *Genetic Resources. Crop Evolution*. **54**, 1011-1021.
- [DJPPHP] Direktorat Jenderal Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian.2013. Pengembangan Keragaman Varietas Kopi Indonesia untuk Pasar Ekspor http://pphp.deptan.go.id/disp_informasi/1/5/54/1546/pengembangan_keragaman_varietas_kopi_indonesia_untuk_pasar_ekspor.html (diunduh 3 Oktober 2013).
- Geleta M, H Isabel, M Arnulfo and B Tomas. 2012. Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. *The Scientific World* 1-11 (doi:10.1100/2012/939820).
- Gil AMT, N Campostriani, L Zolla, C Ciambella, C Invernizzi, and PG Righetti. 2005. Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species. *Proteomics* **5**, 710-718.

- Hendre PS, P Regur, V Annapurna, L Albert and KA Ramesh. 2008.** Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. *BMC Plant Biology* **8**, 1-19 (doi:10.1186/1471-2229-8-51)
- Leroy T, FD Bellis, H Legnate, E Kananura, G Gonzales, LF Pereira, AC Andrade, P Charmetant, C Montagnon, P Cubry. 2011.** Improving the quality of African robustas: QTLs for yield-and quality-related traits in *Coffea canephora*. *Tree Genetics & Genomes* **7**, 781-798
- Liu K and S Muse. 2004.** PowerMarker: new genetic data analysis software. Version 3.0. Free program distributed by the author over the internet from <http://www.powermarker.net> (diunduh 19 Mei 2011).
- Missio RF, ET Caixeta, EM Zambolim, GF Pena, L Zambolim, LAS Dias and NS Sakiyama. 2011.** Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. *Genetics and Molecular Research* **10**, 2366-2381.
- Panggabean E. 2011.** *Buku Pintar Kopi*, 226. Agromedia Pustaka, Jakarta
- Pazzopane CG, N Bonturi, FO Guerreiro, JL Favarin and MP Maluf. 2012.** Gene expression profile during coffee fruit development and identification of candidate markers for phenological stages. *Brazilian Journal of Agricultural Research* **47**, 972-982.
- Piyasatian N, RL Fernando and JCM Dekkers. 2008.** Genomic selection for marker assisted improvement in line crosses. *Theoretical Applied Genetic* **115**, 665-674.
- Poncet V, P Hamon, J Minier, C Carasco, S Hamon, M Noiro. 2004.** SSR cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). *Genome* **47**, 1071-1081.
- Priyono, R Michel and C Dominique. 2010.** Transferability of Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms Marker for Genetic Map Development in *Coffea canephora* Pierre. *Pelita Perkebunan* **26**, 126-141.
- Priyono and U Sumirat. 2012.** Mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) Controlling Cherry and Green Bean Characters in the Robusta Coffee (*Coffea canephora* Pierre). *Journal of Agricultural Science and Technology* **2**, 1029-1039.
- Rogers SO and AJ Bendich. 1985.** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant Tissues. *Plant Molecular Biology* **5**, 69-76.
- Sivetz M and NW Desrosier. 1979.** *Coffee Technology*, 373-379. Avi, Westport, Connecticut.
- VaastP, B Bertrand, JJ Perriot, B Guyot, M Génard. 2006.** Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of *Coffea arabica* L. under optimal conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 197-204.
- Weising K, H Nybom, K Wolff, and W Meyer. 1995.** *DNA Fingerprinting in Plant and Fungi*, 336. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Yahmadi M. 2007.** *Rangkaian Perkembangan dan Permasalahan Budidaya dan Pengolahan Kopi di Indonesia*, 339. Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia. Jawa Timur.