

Analisis Cluster dan Seleksi Primer SSR (*Simple Sequence Repeats*) untuk Sifat Toleran Aluminium pada Cabai

Cluster Analysis and SSR (Simple Sequence Repeats) Primers Selection for Aluminium Tolerance on Hot Pepper

Catur Herison^{1*}, Rustikawati², Ria Meita³, dan Hasanudin⁴

Diterima 10 Desember 2018/Disetujui 07 Januari 2020

ABSTRACT

High yielding and Al tolerant variety of hot pepper is one of the best solutions to overcome the problem of low hot pepper production on acidic dry land. The identification of tolerant parents and SSR markers are useful in increasing the effectiveness of plant breeding programs to develop varieties tolerance to aluminum stress. SSR primer selection is an important initial step in development of molecular markers. The objective of this study was to determine aluminum tolerant genotypes based on the similarity of tolerance to aluminum stress and to determine SSR primers feasible in developing markers for tolerance to aluminum stress in hot pepper plants. The experiment was conducted to evaluate the tolerance of 27 hot pepper genotypes to aluminum stress employing a wick system hydroponic with AB mix nutrient supplemented with 500 ppm $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. The next step is to evaluate 20 SSR primers in amplifying representative tolerant and sensitive DNA genome. The cluster analysis on the tolerance characteristics of 27 hot pepper genotypes resulted in 7 groups of aluminum tolerance. Genotypes of PBC396 and PBC518 were very tolerant to aluminum stress and were unique so that they were the most prospective parents in the development of aluminum tolerant cultivars. SSR primers of TMS7 and CAMS358 were potential to produce polymorphic markers for tolerance to aluminum stress in hot pepper. The primers must then be further tested on the DNA genome of mapping population to determine the ones which can be used as a marker for aluminium tolerance.

Keywords: Capsicum annum, NTSYS, grouping assessment, adaptive to acidic

ABSTRAK

Perakitan varietas unggul cabai merah toleran Al (Aluminium) merupakan solusi terbaik untuk mengatasi persoalan rendahnya produktivitas cabai di lahan kering masam. Identifikasi tetua toleran dan marka SSR (*Simple Sequence Repeats*) sangat bermanfaat dalam meningkatkan efektifitas program pemuliaan tanaman untuk merakit varietas toleran terhadap cekaman aluminium. Seleksi primer SSR adalah bagian awal yang penting dalam pengembangan marka molekuler tersebut. Penelitian bertujuan untuk menentukan kelompok genotipe toleran aluminium dan menentukan primer prospektif dalam pengembangan marka SSR untuk sifat toleran terhadap Al pada tanaman cabai. Evaluasi tingkat toleransi 27 genotipe cabai terhadap cekaman aluminium dilakukan menggunakan hidroponik sistem sumbu dengan larutan hara AB mix ditambah 500 ppm $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. Tahap selanjutnya adalah menguji 20 primer SSR dalam mengamplifikasi DNA genom cabai toleran dan peka yang mewakili. Hasil analisis cluster sifat toleransi terhadap 27 genotipe cabai menghasilkan 7 kelompok tingkat toleransi terhadap aluminium. Individu PBC396 dan PBC518 adalah genotipe yang sangat toleran terhadap cekaman aluminium yang unik sehingga keduanya sangat baik digunakan sebagai tetua dalam pengembangan cabai toleran aluminium. Primer SSR yang potensial menghasilkan marka polimorfik untuk sifat toleran terhadap cekaman aluminium pada cabai adalah TMS7 dan CAMS358. Primer tersebut selanjutnya harus diuji pada *mapping population* untuk menentukan pita yang dapat digunakan sebagai penanda toleransi terhadap aluminium.

Kata kunci: *Capsicum annum*, NTSYS, sidik gerombol, tenggang masam

¹Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu
Jl. WR Supratman, Kandang Limun, Bengkulu 38371
E-mail : catur_herison@unib.ac.id (*penulis korespondensi)

PENDAHULUAN

Semakin berkurangnya lahan subur, sekarang ini lahan sub-optimal bercekaman menjadi alternatif untuk meningkatkan produksi berbagai jenis tanaman. Lahan kering marginal di Indonesia didominasi oleh tanah asam, terutama jenis tanah Ultisol, yang menyumbang sekitar 25% dan hampir 48 000 000 ha (Prasetyo dan Suriadikarta, 2006). Ultisol ditandai oleh tingkat keasaman tanah yang tinggi, Al^+ yang tinggi dan ketersediaan nutrisi P yang rendah, bahan organik yang rendah, dan secara keseluruhan tingkat kesuburannya rendah (Ifansyah, 2014). Kelarutan ion aluminium di dalam tanah yang tinggi menyebabkan tanaman tidak dapat tumbuh dengan baik.

Cekaman aluminium pada berbagai tanaman menghambat pertumbuhan dan mengganggu produktivitas. Pada tanaman cabai, produktivitas tanaman di lahan masam ultisol jauh lebih rendah dibandingkan dengan di lahan andosol (Herison *et al.*, 2017). Oleh karena itu, untuk mendapatkan produksi yang tinggi pada tanah masam dibutuhkan aplikasi bahan pembenah tanah (Choudhary dan Kumar, 2015; Putri, 2016; Hartatik dan Purwani, 2017; Lestari *et al.*, 2017). Cekaman aluminium secara efektif dapat dikurangi melalui peningkatan pH tanah dengan aplikasi kapur (Bhargavaramireddy dan Subramanian, 2016). Namun demikian, aplikasi kapur untuk menyeimbangkan pH tanah secara teknis tidak mudah dan tidak ekonomis terutama pada wilayah yang jauh dari sumber kapur. Oleh karena itu, penelitian yang berfokus pada peningkatan sifat genetik tanaman untuk toleran terhadap cekaman aluminium sangat dibutuhkan.

Program pemuliaan untuk merakit varietas toleran cekaman aluminium memerlukan informasi genetika toleransi terhadap aluminium dan tetua toleran. Toleransi terhadap aluminium dikendalikan secara kuantitatif (Abate *et al.*, 2013) yang berarti terdapat banyak gen yang berkontribusi terhadap sifat toleransi tersebut. Gen-gen pengendali sifat toleran tersebut kemungkinan terdapat pada tetua-tetua yang berbeda. Pemilihan tetua-tetua yang memiliki kekerabatan genetik yang jauh dibutuhkan untuk mengumpulkan sifat yang berbeda dari berbagai tetua (Zhu *et al.*, 2015).

Karakter genotipe toleran atau peka secara fenotipik sangat dipengaruhi lingkungan. Di sisi lain, karakterisasi molekuler lebih akurat karena dapat mengidentifikasi perbedaan pada tingkat lokus. Salah satu penanda molekuler yang sering digunakan dalam pemuliaan tanaman adalah *Simple Sequence Repeats* (SSR). SSR adalah sekuen berulang DNA yang mewakili bagian signifikan dari genom eukariot dan dapat menyajikan penanda genetik yang dapat mendeteksi perbedaan antar genotipe. SSR dapat dikerjakan relatif cepat, sederhana, bersifat polimorfik, kodominan dan stabil (Swapna dan Srivastava, 2012). SSR telah digunakan untuk mempelajari variasi dan karakteristik genotipe dalam program pemuliaan tanaman padi (Prabakaran *et al.*, 2010; Sajib *et al.*, 2012); gandum (Sehgal *et al.*, 2012) dan buncis (Silva *et al.*, 2003). SSR juga telah terbukti dapat mendeteksi ketahanan tanaman tomat terhadap penyakit layu *Fusarium* (Parmar *et al.*, 2013), dan ketahanan terhadap penyakit blas pada tanaman padi (Ashkani *et al.*, 2011).

Studi terdahulu terkait kekerabatan genetik pada umumnya dilakukan menggunakan karakter morfologi dan marka molekuler SSR (Agyare *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017; Herison *et al.*, 2018; Sharmin *et al.*, 2018). Namun sangat sedikit informasi penggunaan karakter toleransi terhadap aluminium dalam studi kekerabatan genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengelompokkan genotipe-genotipe berdasarkan kemiripan sifat toleransi terhadap cekaman aluminium dan menentukan primer SSR yang layak untuk pengembangan marka molekuler yang dapat mendeteksi sifat toleran cekaman aluminium pada cabai merah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu, dan analisis molekuler di Laboratorium Agronomi, Fakultas Pertanian dan Laboratorium Molekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Bengkulu. Penelitian dimulai bulan September 2017 sampai April 2018.

Assay Cekaman Aluminium

Media tanam yang digunakan adalah pasir kali yang dicuci bersih, kemudian dimasukkan ke dalam bak media yang diberi sumbu kapiler yang dihubungkan dengan bak penampung larutan hara (*Wick system hydroponic*) (Kuntz, 2013). Bak media maupun bak penampung larutan hara berbentuk persegi panjang dengan ukuran lebar 30 cm, panjang 50 cm dan tinggi 20 cm. Bak media diletakkan di atas bak penampung larutan hara. Larutan hara yang digunakan dari larutan AB *mix*. Sebagai kontrol adalah perlakuan tanpa penambahan aluminium ke dalam media dan pH dipertahankan pada 6.0-6.5. Perlakuan cekaman dilakukan dengan menambahkan 500 ppm $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ke dalam larutan hara, mengikuti metode Dalimunthe *et al.* (2015), dan pH larutan dipertahankan pada 4.0-4.5. Media tanaman yang digunakan berupa pasir kali yang telah dicuci bersih.

Benih dikecambahkan dalam media kertas lembab hingga muncul radikula, kemudian ditanam di nampan pembibitan hingga tumbuh kotiledon. Kecambah kemudian dipindah-tanam pada bak media dengan jarak 5 cm x 5 cm. Pengaturan pH larutan dilakukan dengan menambahkan 0.1 M HCl atau 0.1 M NaOH sesuai keperluan. Pengaturan pH dilakukan setiap dua hari sekali. Larutan hara diganti setiap lima hari sekali. Ketika berumur empat minggu, seluruh tanaman dicabut dengan cara menyempatkan air ke dalam media tanam hingga akar tanaman dapat diangkat tanpa kerusakan.

Penentuan Indeks Toleransi terhadap Cekaman (ITC)

Dua puluh tujuh genotipe cabai yang diuji meliputi: Tanaka Tsung (TS), PBC155, PBC622, PBC402, PBC518, PBC396, PBC401, Keriting Hitam (KH), Laris, Hot Pepper (HP), PBC157, PBC621, PBC266, PBC592, PBC140, PBC146, PBC067, Kopay, Romario, Ferosa, Mario, Lokal Payakumbuh (LPK), Sempurna, Bogota, PBC398, PBC137, dan PBC521. Jumlah tanaman uji tiap genotipe adalah 15 tanaman. Nilai rata-rata setiap variabel digunakan untuk menentukan *stress tolerance index* (STI) atau indeks toleransi terhadap cekaman (ITC). Variabel yang

diamati meliputi tinggi tanaman, diameter batang, panjang akar, volume akar, bobot segar akar, bobot kering akar, bobot segar tanaman, bobot kering tanaman. Penentuan ITC dilakukan menggunakan rumus sebagaimana dalam penelitian El-Hashash *et al.* (2018).

$$\text{ITC} = (Y_n * Y_c) / (Y_n^2)$$

di mana ITC, Y_n , dan Y_c berturut-turut adalah indeks toleransi terhadap cekaman, nilai pengamatan pada kondisi tidak tercekam (kontrol) dan nilai pengamatan pada kondisi tercekam. Nilai indeks toleransi pada masing-masing peubah selanjutnya dibagi menjadi 5 kelas secara proporsional untuk menentukan sub karakter tingkat toleransi, yaitu ST= sangat toleran, T = toleran, AT = agak toleran, P = peka dan SP = sangat peka. Dari 11 karakter yang diamati diperoleh 55 sub karakter. Analisis data yang dilakukan adalah analisis *cluster* berdasarkan UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Analisis SSR

Analisis SSR dilakukan terhadap DNA cabai yang mewakili kelompok toleran dan peka hasil analisis *cluster*. Data pita DNA yang diperoleh dari amplifikasi setiap genom genotipe terpilih ditabulasi sebagai *fingerprint* data individu. Analisis data dilakukan secara kualitatif dengan melihat polimorfisme pita SSR yang diperoleh pada setiap genotipe.

Isolasi DNA menggunakan metode CTAB suhu rendah melalui dua kali pemurnian DNA genom mengikuti prosedur Herison *et al.* (2012) dengan modifikasi penambahan PVP (*polyvinylpyrrolidone*) dalam proses penggerusan sampel untuk menghilangkan senyawa fenol (Kumar *et al.*, 2015). Amplifikasi menggunakan 20 primer SSR yang terbukti dapat mengamplifikasi genom Solanaceae (Parmar *et al.*, 2013; Haquarsum, 2016) (Tabel 1). Tahapan PCR dan visualisasi hasil elektroforesis mengikuti Haquarsum (2016). PCR dilakukan dalam 20 μL campuran reaksi yang mengandung 4 μL *Buffer*, 0.4 μL MgCl_2 , 0.4 μL dNTP, 0.08 μL KAPA 2G, 5.12 μL aquabides, 5 μL DNA, dan 5 μL primer SSR.

Tabel 1. Daftar primer SSR yang digunakan, urutan basa dan suhu *annealing-nya*

No	Marka SSR	Repeat Sequence	Urutan Nukleotida	Ta (°C)
1	TMS1	(AT)8(GT)16	F: CGCTCCCTTTTGAATTGAG R: TTGCTGTTGTGGTTTTCGAT	59.1
2	TMS2	(GT)41 (TA)6 (CT)9	F: TCTTTTCATTTTCATGTCACGA R: AGGAGACCTTATGATTC AAGG	54.7
3	TMS4	(CT)12 (GATA)12 ATAT (AC)10	F: CGATTAGAGAATGTCCCACAG R: TTACACATACAAATATACATAGTCTG	49.7
4	TMS6	(GATA)45	F: CTCTCTCAATGTTTGTCTTTC R: GCAAGGTAGGTAGCTAGGGA	57.5
5	TMS7	(TA)31 (GATA)13	F: ACAAACCTCAAGATAAGTAAGAGC R: GTGAATTGTGTTTTAACATGG	57.2
6	TMS8	(GATA)87	F: GCGCACCCAAAGTTGAAG R: CCTCATAGGGACGCACATAC	58.0
7	TMS9	(GATA)24	F: TTGGTAATTTATGTTTCGGGA R: TTGAGCCAATTGATTAATAAGTT	54.3
8	TMS17	(GATA)24 (AT)8 (GT)25	F: AATGTAACAACGTGTCATGATTC R: AAGTCACAAACTAAGTTAGGG	50.2
9	SSR-67	(AGA)2 (AAG)7	F: GCACGAGACCAAGCAGATTA R: GGGCCTTTCCTCCAGTAGAC	59.0
10	Tom-144	(TAT)15 (TGT)4	F: CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG R: ACTTTAACTTTATTATTGCGACG	54.1
11	CAMS 024	(TG)14TT(TG)3	F: TGTTGAGGCTTGGGAAAAAC R: CAAGATAATGGGTAGAAAGGCAAC	55.0
12	CAMS 117	(TG)21(TA)3	F: TTGTGGAGGAAACAAGCAAA R: CCTCAGCCCAGGAGACATAA	55.0
13	CAMS 191	(AC)10A(TA)4	F: CCCGAATCCAAGTCATTGAG R: TAAATCCGGTTCCTTTCCT	55.0
14	CAMS 207-2	(AC)4AT(AC)8(AT)3	F: CTCACGAGCCACTTGAACAC R: GCCTTGTTCCTATCCCAAC	55.0
15	CAMS 358	(TG)7	F: GACCCTTCTCCCTTTTCTT R: CACATGGACGGATCCTTTTT	55.0
16	CAMS 309	(GA)12	F: GAAAATCGACCCGTTTTGAA R: TCAATTCGGACAAAATTAGCAA	51.0
17	CACCEL1 i	(AT)16	F: CTCTAATAGGCAATAGCTCACATGC R: GCAGTCTCCCAGAACGTTGTCC	51.0
18	SLM6 49	TA)24	F: ATTGATGGATTGGCGTTCTC R: AAAATCAGGGGTGAATTTAACG	51.0
19	CM 0011	(AC)5(TA)8	F: TCTGCTTTAAAAACACATACAT R: CATTCTTAACTGAAATTGCATG	51.0
20	CA 514272	(CCG)6	F: ATCTATTTTCTCCGGCGAC R: CCGTAAGCTGCCTTGATCTC	51.0

Keterangan: F=forward, R=reverse.

Tahapan PCR meliputi pre denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit, 45 kali siklus yang terdiri: denaturasi pada suhu 94 °C selama 55 detik, *annealing* pada suhu sesuai primer selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72 °C selama 1 menit, dan terakhir berupa elongasi akhir selama 10 menit pada suhu 72 °C. Hasil amplifikasi dielektroforesis horizontal menggunakan *agarose* 1.5% dan *buffer* TAE 0.5% dengan tegangan 90 volt selama 50 menit. Pewarnaan dilakukan menggunakan *ethidium bromide* dan visualisasi menggunakan *UV transluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Toleransi terhadap Cekaman Aluminium pada Cabai

Hasil penghitungan indeks toleransi terhadap cekaman (ITC) pada setiap peubah menunjukkan bahwa dalam 27 genotipe yang diuji terdapat variasi tingkat toleransi yang cukup tinggi berkisar antara 15.0% - 81.8% (Tabel 2). Variasi tingkat toleransi yang termasuk dalam kelompok rendah diperoleh pada peubah tinggi tanaman, jumlah daun, kehijauan daun, diameter batang dan panjang akar. Variasi sedang diperoleh pada peubah

volume akar dan luas daun. Variasi yang tinggi diperoleh pada bobot segar akar, bobot segar tajuk, dan bobot segar tanaman. Sedangkan variasi yang sangat tinggi diperoleh pada bobot kering tanaman.

Nilai indeks toleransi pada setiap peubah yang diamati juga menggambarkan bersarnya penurunan hasil pengamatan akibat cekaman alumunium. Tinggi tanaman mengalami penurunan akibat cekaman aluminium berkisar dari 46% (IT=0.54) hingga 72% (IT=0.28). Penurunan yang paling tinggi terlihat pada genotipe Bogota dan yang paling rendah pada Tanaka Tsung. Berdasarkan pada peubah jumlah daun, Lokal Payakumbuh dengan penurunan jumlah daun terendah yaitu hanya 16% (IT=0.84), sedangkan genotipe PBC402 adalah yang paling peka karena penurunan jumlah daun berkurang hingga 58% (IT=0.42).

Pada beberapa genotipe, cekaman aluminium ternyata menyebabkan peningkatan kehijauan daun, sebagaimana terlihat pada genotipe PBC622, PBC592,

Mario, dan PBC396 dengan nilai indeks toleransi terhadap cekaman lebih besar dari 1, sedangkan genotipe PBC621 mengalami penurunan kehijauan daun terbesar yaitu 37%. Berdasarkan diameter batang, genotipe Tanaka Tsung adalah yang paling toleran dengan penurunan nilai sebesar 49% dan genotipe PBC402 adalah yang paling peka dengan penurunan nilai hingga 75%. Berdasarkan peubah panjang akar, genotipe PBC 622 adalah yang paling toleran sedangkan genotipe Bogota adalah yang paling peka. Berdasarkan peubah volume akar dan bobot segar akar, genotipe PBC396 adalah yang paling toleran, sedangkan yang paling peka berturut-turut adalah PBC 402 dan PBC398. Jika dilihat pada luas daun, bobot segar tajuk dan bobot segar tanaman, maka PBC140 adalah yang paling toleran, sedangkan PBC402 dan PBC137 adalah yang paling peka. Sedangkan berdasarkan bobot kering tanaman, maka genotipe PBC592 adalah yang paling toleran dan PBC137 adalah yang paling peka.

Tabel 2. Nilai indeks toleransi terhadap cekaman alumunium 27 genotipe cabai

Genotipe	TT	JD	KD	DB	PA	VA	BSA	BST	BSTan	BKTan	LD
PBC067	0.31	0.72	0.81	0.44	0.71	0.33	0.30	0.14	0.15	0.07	0.12
PBC137	0.30	0.61	0.92	0.27	0.64	0.25	0.10	0.05	0.05	0.01	0.15
PBC140	0.49	0.65	0.84	0.45	0.91	0.75	0.13	0.36	0.42	0.10	0.37
PBC146	0.41	0.73	0.78	0.41	0.67	0.30	0.11	0.13	0.12	0.04	0.20
PBC155	0.34	0.65	0.72	0.32	0.82	0.44	0.43	0.15	0.16	0.05	0.13
PBC157	0.33	0.45	0.92	0.35	0.78	0.34	0.19	0.11	0.12	0.04	0.14
PBC266	0.37	0.64	0.72	0.45	0.84	0.28	0.17	0.16	0.16	0.03	0.08
PBC396	0.42	0.73	1.03	0.40	0.88	0.76	0.78	0.25	0.28	0.08	0.25
PBC398	0.39	0.61	0.70	0.26	0.52	0.30	0.06	0.08	0.08	0.02	0.19
PBC401	0.36	0.81	0.82	0.38	0.72	0.37	0.27	0.11	0.12	0.02	0.09
PBC402	0.31	0.42	0.83	0.25	0.58	0.20	0.15	0.07	0.07	0.02	0.07
PBC518	0.35	0.69	0.83	0.41	0.72	0.62	0.41	0.19	0.21	0.06	0.20
PBC521	0.37	0.71	0.89	0.37	0.75	0.32	0.34	0.16	0.17	0.04	0.24
PBC592	0.45	0.71	1.12	0.42	0.50	0.42	0.48	0.34	0.35	0.23	0.25
PBC621	0.31	0.44	0.63	0.31	0.64	0.34	0.08	0.12	0.15	0.06	0.16
PBC622	0.32	0.80	1.17	0.41	0.91	0.43	0.30	0.10	0.11	0.04	0.19
BOGOTA	0.28	0.54	0.86	0.30	0.49	0.34	0.26	0.13	0.14	0.06	0.15
FEROSA	0.34	0.58	0.64	0.41	0.61	0.23	0.14	0.10	0.11	0.03	0.15
Hot Pepper	0.32	0.53	0.92	0.27	0.63	0.25	0.13	0.11	0.11	0.04	0.13
K. Hitam	0.39	0.60	0.89	0.36	0.79	0.31	0.28	0.15	0.16	0.04	0.17
KOPAY	0.31	0.66	0.95	0.46	0.61	0.24	0.21	0.11	0.12	0.03	0.14
LARIS	0.42	0.69	0.79	0.35	0.67	0.32	0.28	0.15	0.16	0.07	0.13
LPK	0.29	0.84	0.90	0.33	0.59	0.23	0.21	0.18	0.18	0.09	0.19
MARIO	0.41	0.61	1.02	0.35	0.66	0.24	0.13	0.06	0.07	0.01	0.10
ROMARIO	0.40	0.66	0.93	0.38	0.52	0.35	0.43	0.12	0.14	0.04	0.18
SEMPURNA	0.37	0.67	0.92	0.29	0.78	0.29	0.08	0.07	0.07	0.04	0.07
TS	0.54	0.62	0.78	0.51	0.81	0.36	0.31	0.10	0.11	0.13	0.19
Rerata	0.37	0.64	0.86	0.37	0.69	0.36	0.25	0.14	0.15	0.06	0.16
CV (%)	16.78	16.24	15.02	18.76	17.77	40.54	63.29	53.15	55.61	81.81	39.76

Keterangan: TT= Tinggi tanaman; JD= Jumlah daun; KD= Kehijauan daun; DB= Diameter batang; PA= Panjang akar; VA=Volume akar; BSA= Bobor segar akar; BST= Bobot segar tajuk; BSTan= Bobot segar tanaman; BKTan= Bobot kering tanaman; LD= Luas daun.

Pada beberapa genotipe, cekaman aluminium ternyata menyebabkan peningkatan kehijauan daun, sebagaimana terlihat pada genotipe PBC622, PBC592, Mario, dan PBC396 dengan nilai indeks toleransi terhadap cekaman lebih besar dari 1, sedangkan genotipe PBC621 mengalami penurunan kehijauan daun terbesar yaitu 37%. Berdasarkan diameter batang, genotipe Tanaka Tsung adalah yang paling toleran dengan penurunan nilai sebesar 49% dan genotipe PBC402 adalah yang paling peka dengan penurunan nilai hingga 75%. Berdasarkan peubah panjang akar, genotipe PBC 622 adalah yang paling toleran sedangkan genotipe Bogota adalah yang paling peka. Berdasarkan peubah volume akar dan bobot segar akar, genotipe PBC396 adalah yang paling toleran, sedangkan yang paling peka berturut-turut adalah PBC 402 dan PBC398. Jika dilihat pada luas daun, bobot segar tajuk dan bobot segar tanaman, maka PBC140 adalah yang paling toleran, sedangkan PBC402 dan PBC137 adalah yang paling peka. Sementara itu berdasarkan bobot kering tanaman, maka genotipe PBC592 adalah yang paling toleran dan PBC137 adalah yang paling peka.

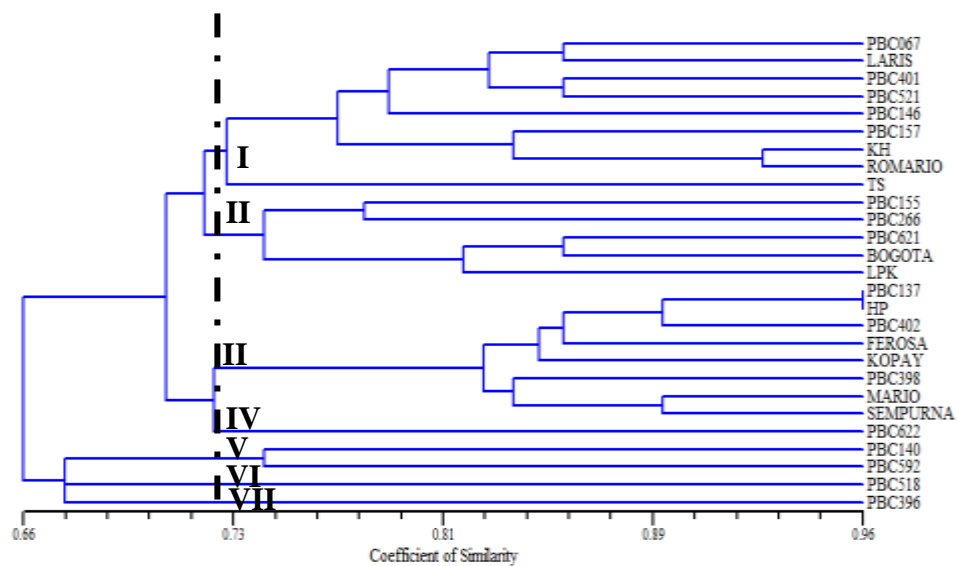
Cekaman aluminium menyebabkan tanaman berkurang pertumbuhan dan produktivitasnya. Keracunan aluminium mengganggu serapan hara dan diferensiasi sel (Silva *et al.*, 2010) sekalipun pembelahan sel meningkat (Cao *et al.*, 2011). Keracunan aluminium juga meningkatkan ketebalan daun (Konarska, 2010) dan akar (Alvarez *et al.*, 2012). Genotipe-genotipe yang toleran memiliki karakteristik yang relatif tidak berbeda pada kondisi tercekam dibandingkan pada kondisi tidak tercekam. Mekanisme toleransi terhadap keracunan aluminium dapat berlangsung secara eksternal, yaitu terjadi detoksifikasi Al akibat tanaman mengeluarkan sekresi asam oksalat dari akar, dan secara internal yaitu melalui detoksifikasi Al dengan membentuk senyawa kompleks Al dengan asam organik sehingga tidak beracun bagi tanaman dan menyimpannya di dalam vakuola (Wang *et al.*, 2015). Kemampuan mengeluarkan senyawa oksalat yang dapat menetralkan Al dan kemampuan mengakumulasi Al di dalam vakuola sangat

bervariasi antar spesies bahkan antar varietas dalam satu spesies yang menyebabkan tingkat toleransi yang bervariasi (Pattanayak dan Pfkrei, 2013).

Penentuan genotipe yang toleran terhadap cekaman aluminium seringkali tidak mudah karena tergantung dari peubah yang digunakan. Beberapa peneliti menggunakan peubah utama panjang akar untuk menentukan tingkat toleransi (Khu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Awasthi *et al.*, 2017). Hal tersebut didasarkan bahwa penurunan panjang akar adalah yang paling awal teramati jika tanaman keracunan aluminium (Abate *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini penentuan genotipe-genotipe toleran dilakukan dengan pendekatan *clustering* dengan UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) berdasarkan nilai indeks toleransi terhadap cekaman pada seluruh peubah yang diamati, dengan demikian maka seluruh peubah berkontribusi dalam menyusun nilai tingkat toleransi.

Clustering Tingkat Toleransi Cabai terhadap Cekaman Aluminium

Analisis *cluster* dilakukan menggunakan cara pengelompokan Ahmad *et al.* (2013) tetapi dimodifikasi menggunakan data nilai STI (*stress tolerance index*). Analisis menggunakan program aplikasi NTSYS 2.0 dengan metode UPGMA dengan tingkat kemiripan (*similarity coefficient*) 72%, 27 genotipe yang diuji mengelompok menjadi 7 kelompok. Kelompok I terdiri atas 9 genotipe yang meliputi PBC 067, Laris, PBC401, PBC521, PBC146, PBC137, Keriting Hitam, Romario, dan Tanaka Tsung. Kelompok II meliputi 5 genotipe, yaitu PBC155, PBC266, PBC621, Bogota, dan Lokal Payakumbuh (LPK). Kelompok III terdiri atas 8 genotipe, yaitu PBC137, Hot Pepper (HP), PBC402, Ferosa, Kopay, PBC398, Mario, dan Sempurna. Kelompok IV hanya memiliki 1 genotipe, yaitu PBC622. Kelompok V meliputi 2 genotipe, yaitu PBC140 dan PBC592 (Gambar 1), sedangkan kelompok VI dan VII masing-masing beranggotakan 1 genotipe yaitu, secara berturut-turut, PBC518 dan PBC396.



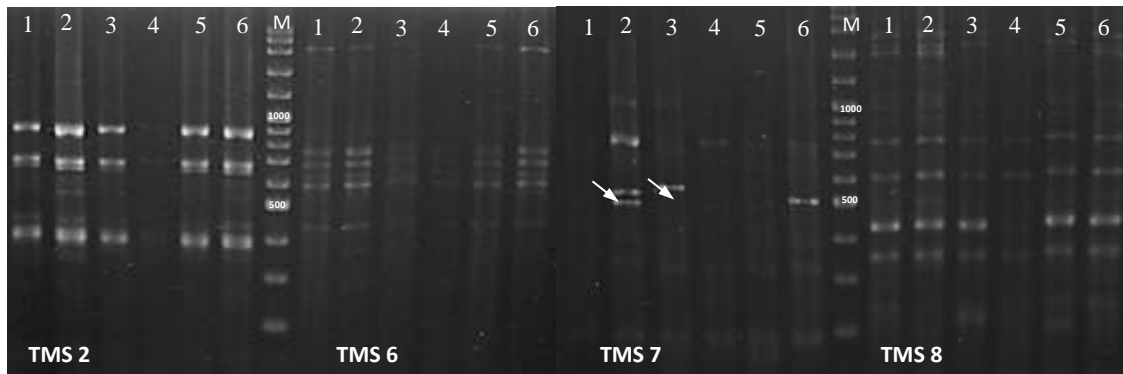
Gambar 1. Dendrogram toleransi terhadap aluminium pada 27 genotipe cabai merah

Kelompok I, II dan III adalah kelompok yang meliputi paling banyak variasi genotipe sedangkan lainnya relatif sedikit. Kelompok I dan II adalah kelompok peka, kelompok III agak toleran, kelompok IV dan V toleran dan kelompok VI dan VII sangat toleran. Hasil analisis cluster tersebut menunjukkan bahwa beberapa genotipe yang termasuk dalam kategori toleran dan sangat toleran adalah unik yang berbeda dengan genotipe lainnya. Misalnya genotipe PBC396 dan PBC518, yang membentuk kelompok yang berbeda. Genotipe sangat toleran yang unik tersebut sangat berguna sebagai tetua donor sifat toleran dalam program pemuliaan untuk merakit kultivar yang toleran terhadap cekaman (Sun *et al.*, 2013). Toleransi terhadap cekaman aluminium dikendalikan oleh banyak gen (Abate *et al.*, 2013) maka kemungkinan gen pengendali sifat tersebut tersebar pada beberapa genotipe tetua toleran. Menggabungkan gen toleransi dari berbagai tetua donor yang berkerabat jauh ke dalam satu genotipe melalui piramidisasi menjadi lebih efektif. Marka molekuler telah diakui sangat membantu untuk mempercepat proses seleksi dan memisahkan individu berdasarkan sifat yang secara morfologis tidak tampak. Seleksi primer merupakan tahapan yang sangat penting dalam pengembangan marka molekuler untuk sifat tertentu.

Seleksi Primer SSR pada Cabai untuk Cekaman Aluminium

Berdasarkan hasil analisis *clustering* (Gambar 1) ditetapkan 6 genotipe yang mewakili kelompok toleran dan peka untuk dilakukan *fingerprint* menggunakan marka SSR. Keenam genotipe cabai tersebut adalah PBC396 dan PBC622 yang mewakili genotipe toleran, PBC398 (agak toleran) serta Keriting Hitam, PBC146, Laris (peka). Amplifikasi menggunakan 20 primer SSR diperoleh informasi bahwa hanya 13 primer yang sesuai dengan DNA genom cabai yang diuji. Primer yang tidak sesuai untuk cabai adalah SLM649, CM0011, CA514272, TMS4, SSR-67 dan Tom-144. Seluruh primer yang digunakan dalam penelitian ini telah digunakan dalam karakterisasi cabai (Ulhoa *et al.*, 2014). Perbedaan hasil ini kemungkinan berkaitan dengan materi genetik yang berbeda.

Jumlah pita yang dihasilkan dari masing-masing primer berkisar antara 3 hingga 18 pita. Contoh visualisasi hasil amplifikasi menggunakan primer TMS 2, TMS 6, TMS 7 dan TMS 8 ditunjukkan pada Gambar 2. Tigabelas primer SSR yang mampu mengamplifikasi DNA cabai menghasilkan 117 marka dan 38 diantaranya adalah polimorfik. Di antara marka polimorfik tersebut terdapat 25 yang polimorfik untuk sifat toleran terhadap aluminium, yaitu pita muncul pada individu tanaman toleran tetapi tidak muncul pada tanaman peka.



Gambar 2. Visualisasi hasil amplifikasi DNA menggunakan primer SSR TMS2, TMS6, TMS 7 dan TMS8 terhadap DNA genom cabai Keriting Hitam (1), PBC622 (2), PBC396 (3), PBC146 (4), PBC398 (5), dan Laris (6). Elektroforesis menggunakan agarose 1.5%.

Tabel 3. Karakteristik marka SSR dari primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA cabai

Primer	Jumlah Total Pita	Jumlah Pita Monomorfik	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Polimorfik Toleran
CAMS024	11	10	1	1
CAMS117	10	8	2	2
CAMS191	7	7	0	0
CAMS207-2	3	3	0	0
CAMS358	14	5	9	7
CAMS309	5	5	0	0
CACCEL1i	5	3	2	1
TMS2	8	6	2	2
TMS6	7	6	1	1
TMS7	18	5	13	8
TMS8	11	10	1	1
TMS9	12	8	4	2
TMS17	6	3	3	0
Jumlah	117	79	38	25

Primer yang menghasilkan marka polimorfik toleran terbanyak adalah TMS7 yang menghasilkan 8 marka, diikuti oleh primer CAMS358 yang menghasilkan marka toleran yang banyak yaitu 7 marka (Tabel 3). Seleksi primer merupakan tahapan yang penting dalam pengembangan marka untuk membantu dalam seleksi (*marker assisted selection-MAS*). (Mutai *et al.*, 2016) melakukan tahapan seleksi primer dalam upaya mengembangkan MAS untuk toleransi tanaman teh terhadap kekeringan dan (Mondal *et al.*, 2013) pada pengembangan MAS untuk toleransi terhadap salinitas pada padi. Primer-primer yang menghasilkan marka polimorfik untuk sifat toleran selanjutnya dapat dijadikan kandidat untuk analisis *bulk segregation analysis* (BSA) menggunakan *mapping population* pada tahap selanjutnya. Dengan demikian maka, dari 20 primer yang diseleksi, TMS7 dan CAMS358 adalah primer terbaik yang

berpotensi menghasilkan marka untuk toleransi terhadap cekaman aluminium.

KESIMPULAN

Analisis cluster terhadap sifat toleransi terhadap 27 genotipe cabai menghasilkan 7 kelompok yang memiliki tingkat toleransi terhadap aluminium yang berbeda. Individu PBC396 dan PBC518 adalah genotipe yang sangat toleran dan masing-masing unik. Primer SSR TMS7 dan CAMS358 adalah primer yang potensial menghasilkan marka polimorfik untuk sifat toleran terhadap cekaman aluminium pada cabai merah.

DAFTAR PUSTAKA

- Abate, E., S. Hussien, M. Laing, F. Mengistu. 2013. Aluminium toxicity tolerance in cereals: Mechanisms, genetic control and breeding methods. *AJAR*. 8(9): 711-722.
- Agyare, R.Y., R. Akromah, M.S. Abdulaic. 2016. Assessment of genetic diversity in pepper (*Capsicum* sp.) landraces from Ghana using agro-morphological characters. *Journal of Experimental Agriculture International*. 1-16.
- Ahmad, M., A. Shahzad, M. Iqbal, M. Asif, A.H. Hirani. 2013. Morphological and molecular genetic variation in wheat for salinity tolerance at germination and early seedling stage. *Aus. J. Crop Sci.* 7(1): 66-74.
- Alvarez, I., O. Sam, I. Reynaldo, P. Testillano, M.C. Risueño, M. Arias. 2012. Morphological and cellular changes in rice roots (*Oryza sativa* L.) caused by Al stress. *Bot. Studies*. 53(1):67-73.
- Ashkani, S., M.Y. Rafii, M. Sariah, N.A.A. Siti, I. Rusli. 2011. Analysis of simple sequence repeat markers linked with blast disease resistance genes in a segregating population of rice (*Oryza sativa*). *Genet. Mol. Res.* 10(3):1345-1355.
- Awasthi, J.P., B. Saha, P. Regon, S. Sahoo, U. Chowra, A. Pradhan, A. Roy, S.K. Panda. 2017. Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. *PloS one*. 12(4):e0176357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176357>.
- Baba, V.Y., K.R. Rocha, G.P. Gomes, C. de Fátima Ruas, P.M. Ruas. 2016. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 63(8):1371-1381.
- Bhargavareddy, C.H., K.S. Subramanian. 2016. Nano-lime for remediation of soil acidity: Synthesis and characterization. *Curr. Adv. Agric. Sci.* 8(1):39-43.
- Cao, Y., Y. Lou, Y. Han, J. Shi, Y. Wang, W. Wang, F. Ming. 2011. Al toxicity leads to enhanced cell division and changed photosynthesis in *Oryza rufipogon* L. *Mol. Biol. Rep.* 38(8):48394846. doi: 10.1007/s11033-010-0618-9.
- Carvalho, S.I.C., L.B. Bianchetti, C.F. Ragassi, C.S.C. Ribeiro, F.J.B. Reifschneider. 2017. Genetic variability of a Brazilian *Capsicum frutescens* germplasm collection using morphological characteristics and SSR markers. *Embrapa Hortaliças-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Choudhary, V.K., P.S. Kumar. 2015. Amelioration of Acidic Soil and Production Performance of Cowpea by the Application of Different Organic Manures in Eastern Himalayan Region, India. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 46(20):2523-2533. doi:10.1080/00103624.2015.1081928.
- Dalimunthe, S.R., A.B. Arif, I.B. Jamal. 2015. Uji ketahanan terhadap aluminium dan pH rendah pada jagung (*Zea mays* L) varietas pioneer dan srikandi secara *in vitro*. *J. Pert. Trop.* 2(3):292-299.
- El-Hashash, E.F., R.Y.A. EL-Agoury, K.M. El-Absy, S.M.I. Sakr. 2018. Genetic parameters, multivariate analysis and tolerance indices of rice genotypes under normal and drought stress environments. *Asian J. Res. Crop Sci.* 1(3):1-18.
- Haquarsum, E.J.V. 2016. Seleksi dan Studi Pewarisan serta Pengembangan Marka SSR Penanda Ketahanan terhadap Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia Solanacearum*) pada Tomat. Tesis. <http://repository.ipb.ac.id/xmlui/handle/123456789/82697> (8 Desember 2018).

- Hartatik, W., J. Purwani. 2017. Peningkatan produktivitas kedelai (*Glycine max* L.) pada Typic Kanhapludults dengan aplikasi pembenah tanah dan pupuk NPK. *J. Tanah dan Iklim*. 41(2):123-134. doi: 10.2017/jti.v41i2.6168.
- Herison, C., M. Handajaningsih, F. Fahrurrozi, R. Rustikawati. 2017. Wet season trials on growth and yield of six newly developed chili pepper hybrids at three different locations. *Ijaseit*. 7(5): 1913-1919. doi:10.18517/ijaseit.7.5. 2515.
- Herison, C., S. Winarsih, M. Handayaningsih, Rustikawati. 2012. DNA marker-assisted and morphological selection on BC3 genotypes shortcut the introgression of CMV tolerance genes on chili pepper. *Agrivita. J. Agric. Sci*. 34(3):215-224.
- Herison, C., S.H. Sutjahjo, I. Sulastrini, Rustikawati, S. Marwiyah. 2018. Genetic diversity analysis in 27 tomato accessions using morphological and molecular markers. *Agrivita, J. Agric. Sci*. 40(1):36-44.
- Ifansyah, H. 2014. Soil pH and solubility of aluminum, iron, and phosphorus in Ultisols: the roles of humic acid. *J. Tanah Trop*. 18(3):203-208.
- Khu, D.M., R. Reyno, E.C. Brummer, M.J. Monteros. 2012. Screening methods for aluminum tolerance in alfalfa. *Crop Sci*. 52(1): 161167. doi:10.2135/cropsci2011.05.0256.
- Konarska, A. 2010. Effects of aluminum on growth and structure of red pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *Acta Physiol. Plant*. 32(1):145. doi:10.1007/s11738-009-0390-4.
- Kuntz, L.B. 2013. Wick irrigation systems for subsistence farming. <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/83726> (8 Oktober 2017).
- Lestari, T., Trikusumaningtyas, S.W. Ardie, D. Sopandie. 2017. The Role of Phosphorus in Improving Sorghum Tolerance to Aluminum Stress. *J. Agron. Indonesia*. 45(1):43-48.
- Mondal, U., M.S.R. Khanom, L. Hassan, S.N. Begum. 2013. Foreground selection through SSRs markers for the development of salt tolerant rice variety. *J. Bangladesh Agric. Univ*. 11(1):67-72.
- Mutai, C., S.M. Kamunya, R.C. Muoki, S. Runo, A.J. Mgtu, M. Wamalwa, T.K. Maritim, F.N. Wachira, R.K. Korir. 2016. Development of EST-SSR primers for marker-assisted selection for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Tea*. 37(1/2): 129-138.
- Parmar, P., A. Sudhir, R. Preethi, B. Dave, K. Panchal, R.B. Subramanian, A. Patel, K.B. Kathiria, . 2013. Identification of a SSR marker (TOM-144) linked to Fusarium wilt resistance in *Solanum lycopersicum*. *Amer. J. Mol. Biol*. 3:241-247.
- Pattanayak, A., K. Pfukrei. 2013. Aluminium toxicity tolerance in crop plants: Present status of research. *African J. Biotech*. 12(24):3752-3757.
- Prabakaran, A., K. Paramasivam, T. Rajesh, D. Rajarajan. 2010. Molecular characterization of rice land races using SSR markers. *Electron. J. Plant Breed*. 1(4):512-516.
- Prasetyo, B.H., D.A. Suriadikarta. 2006. Karakteristik, potensi, dan teknologi pengelolaan tanah Ultisol untuk pengembangan pertanian lahan kering di Indonesia. *J. Litbang Pertanian*. 25(2): 39-46.
- Putri, T.N. 2016. Pengaruh Dosis Pupuk Organonitrofos Plus, Pupuk Anorganik, dan Biochar terhadap Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Jagung Manis (*Zea Mays Saccharata* L.) pada Tanah Ultisols Taman Bogo. Skripsi Unila. <http://digilib.unila.ac.id/id/eprint/24457>.

- Sajib, A.M., M. Hossain, A. Mosnaz, H. Hossain, M. Islam, S. Ali, S.H. Prodhan. 2012. SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.). J. BioSci. Biotech. 1(2):107-116.
- Sehgal, S.A., R.A. Tahir, M. Nawaz. 2012. Molecular characterization of wheat genotypes using SSR markers. Int. J. Bioautomation. 16(2):119-128.
- Sharmin, A., M.E. Hoque, M.M. Haque, F. Khatun. 2018. Molecular diversity analysis of some chilli (*Capsicum* spp.) genotypes using SSR markers. American Journal of Plant Sciences. 9(3):368-379.
- Silva, G.F. da, J.B. dos Santos, M.A.P. Ramalho. 2003. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. Genetics Mol. Biol. 26(4):459-463.
- Silva, S., O. Pinto-Carnide, P. Martins-Lopes, M. Matos, H. Guedes-Pinto, C. Santos. 2010. Differential aluminium changes on nutrient accumulation and root differentiation in an Al sensitive vs. tolerant wheat. Environ. Exp. Bot. 68(1):91-98.
- Sun, J., H. Luo, J. Fu, B. Huang. 2013. Classification of genetic variation for drought tolerance in tall fescue using physiological traits and molecular markers. Crop Sci. 53(2):647-654.
- Swapna, M., M.S. Srivastava. 2012. Molecular Marker Applications for Improving Sugar Content in Sugarcane. Springer, London.
- Ulhoa, A.B., T.N. Pereira, R.N. Silva, C.F. Ragassi, R. Rodrigues, M.G. Pereira, F.J. Reifschneider. 2014. Caracterização molecular de linhagens de pimenta do tipo jalapeño amarelo. Horticultura Brasileira 32(1):35-40. doi: 10.1590/hb.v32i01.197.
- Wang, H., R.F. Chen, T. Iwashita, R.F. Shen, J.F. Ma. 2015. Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. New Phytol. 205(1): 273-279. doi: 10.1111/nph.13011.
- Zhu, Z., X. Xu, B. Cao, C. Chen, Q. Chen, C. Xiang, G. Chen, J. Lei. 2015. Pyramiding of AtEDT1/HDG11 and Cry2Aa2 into pepper (*Capsicum annuum* L.) enhances drought tolerance and insect resistance without yield decrease. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 120(3):919-932.