

Keragaman Genetik DNA Beberapa Origin Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Menggunakan Primer Terkait Biosintesis Asam Oleat dan Primer SSR

*DNA genetic diversity analysis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using specific primer for oleic acid and SSR primers*

Sylvia Bianca S Sihombing, Lollie Agustina P. Putri*, Luthfi Aziz Mahmud Siregar
Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan 20155
*Corresponding author: lolliie.agustina@usu.ac.id

ABSTRACT

Genetic diversity in a plant population is very important, so that selection with the aim of obtaining superior characters can be done. Genetic diversity can occur due to changes in the nucleotides of DNA constituents. The aim of the research was to analyze genetic diversity of origin oil palm DNA by using specific primer for oleic acid and SSR primer. This research was conducted in Plant Tissue Culture Laboratory, Faculty of Agriculture, Universitas Sumatera Utara, from March to July 2017. A total of 36 origin of oil palm DNA stock samples issued by PT. Socfin Indonesia was identified using specific ILY-2 primer marker for oleic acid, FR-3300 primer and FR-1753 primer. The results showed analysis of phylogenetic dendrogram using DARwin 6.0.13 spread 36 samples into three main groups. The first group consist of 12 samples, the second groups consist of 19 samples and the third group consist of 2 samples.

Keywords: oil palm, ILY-2 Primer, oleic acid, polymerase chain reaction, SSR primer

ABSTRAK

Keragaman genetik dalam suatu populasi tanaman sangat penting, agar seleksi dengan maksud untuk mendapatkan karakter-karakter unggul dapat dilakukan. Keanekaragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik DNA origin kelapa sawit dengan menggunakan primerspesifik untuk asam oleat. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, dimulai dari bulan Maret hingga Juli 2017. 36 sampel stok DNA dari tanaman kelapa sawit yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia diidentifikasi menggunakan primer spesifik ILY-2 untuk karakter asam oleat, primer FR-3300 dan primer FR-1753. Hasil penelitian menunjukkan analisis filogenik dendrogram menggunakan DARwin 6.0.13 membagi 36 sampel menjadi tiga kelompok utama. Kelompok pertama sebanyak 12 sampel, kelompok kedua sebanyak 19 sampel, dan kelompok ketiga sebanyak 2 sampel.

Kata kunci: asam oleat, kelapa sawit, ILY-2 primer, polymerase chain reaction, primer SSR

PENDAHULUAN

Kelapa sawit adalah penghasil minyak nabati terbesar di dunia karena minyaknya dapat diproduksi baik dari serabut buah maupun inti. Menurut Direktorat Jendral Perkebunan (2016) Pengembangan komoditas ekspor kelapa sawit terus meningkat dari tahun ke tahun, terlihat dari rata-rata laju pertumbuhan luas areal kelapa sawit selama

2004-2014 sebesar 7,67%, sedangkan produksi kelapa sawit meningkat rata-rata 11,09% per tahun. Pada Tahun 2014 luas areal kelapa sawit mencapai 10,9 juta Ha dengan produksii 29,3 juta ton CPO. Luas areal menurut status pengusahaannya milik rakyat (Perkebunan Rakyat) seluas 4,55 juta Ha atau 41,55% dari total luas areal, milik negara (PTPN) seluas 0,75 juta Ha atau 6,83% dari total luas areal, milik swasta seluas 5,66 juta Ha atau 51,62%,

swasta terbagi menjadi 2 (dua) yaitu swasta asing seluas 0,17 juta Ha atau 1,54% dan sisanya lokal (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2016).

Biosintesis minyak pada buah kelapa sawit tidak terlepas dari proses biosintesis asam lemak pada mesokarpa dan inti biji (kernel). Asam oleat merupakan salah satu komponen utama asam lemak tidak jenuh tunggal pada minyak sawit yang baik untuk kesehatan. Terdapat korelasi positif antara tingginya kandungan asam lemak tidak jenuh dengan tingginya nilai iodine pada minyak sawit, nilai iodine *E. Oleifera* 80 sedangkan *E. guineensis* 50 (Rajanaidu *et al*, 2000).

Mesokarpa buah kelapa sawit merupakan sumber penghasil minyak terbesar pada tanaman kelapa sawit. Perbaikan kualitas minyak yang dihasilkan mesokarpa penting dilakukan untuk perkembangan industri kelapa sawit pada masa sekarang dan yang akan datang. Kualitas minyak berkaitan erat dengan biosintesis pembentukan asam lemak dan perbandingan komposisi asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh yang dihasilkan tanaman, kualitas minyak berkorelasi dengan kandungan asam lemak tidak jenuh, semakin tinggi kandungan asam lemak tidak jenuh (asam oleat) kualitas minyak juga semakin tinggi. Lintasan pembentukan asam lemak tidak jenuh pada kelapa sawit diawali oleh aktifitas gen SAD. Primer ILY-2 telah didesain oleh (Setiyo, 2005) berdasarkan literatur biosintesis asam oleat dan telah di aplikasikan pada plasma nutfah kelapa sawit Indonesia (Setiyo *et al*, 2005).

Keanekaragaman genetik dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA. Perubahan ini mungkin dapat mempengaruhi fenotipe suatu organisme yang dapat dilihat secara langsung atau mempengaruhi reaksi individu terhadap lingkungan tertentu. Secara umum keanekaragaman genetik dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi, atau migrasi gen dari satu tempat ke tempat lain (Suryanto, 2003).

Keragaman genetik dalam suatu populasi tanaman sangat penting, agar seleksi dengan maksud untuk mendapatkan karakter-karakter unggul dapat dilakukan. Makin tinggi

keragaman genetik maka peluang untuk mendapatkan genotipe unggul semakin besar dan menunjukkan besarnya pengaruh genetik terhadap sifat yang diekspresikan (Pandin, 2010).

Penelitian menggunakan primer spesifik untuk mengidentifikasi gen-gen tertentu telah banyak dilakukan. Primer untuk ILY-2 berhasil dirancang berdasarkan daerah homologi gen pada beberapa spesies tanaman menggunakan akses internet dan dapat digunakan mengamplifikasi fragmen DNA kelapa sawit dengan menghasilkan satu atau lebih amplicon (pita) (Setiyo, 2005).

Marka *Simple Sequence Repeats* (SSR) telah digunakan dalam studi genetik pada kelapa sawit, diantaranya lokasi marka yang menyebar di seluruh genom tanaman, bersifat kodominan dan mudah diamplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk saat ini marka SSR merupakan marka paling prospektif (Putri, 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik beberapa origin kelapa sawit terkait dengan biosintesis asam oleat dan primer SSR yaitu primer FR-3300 dan FR-1753.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Juli 2017. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 sampel daging buah muda, 20 sampel daun muda (daun tombak), yang berasal daritanaman kelapa sawit yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia yang sudah dalam bentuk stock DNA yang berasal dari penelitian Putri *et al* (2016), air, amplop coklat, plastik, aquades, ddH₂O, aluminium foil, *Polyvinylpyrrolidone* (PVPP) (*Promega*,77627), nitrogen cair, buffer ekstraksi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), β -*mercaptoethanol*, tabung *Eppendorf* (ukuran 2 ml dan 1,5 ml), tabung PCR 0,2 ml, Kloroform Isoamil Alkohol (KIAA), isopropanol, buffer TE, ethanol absolute, ethanol 70 %, larutan TBE 1x dan

0,5x, larutan TAE 1x, gel agarose (*Promega*,V3121), etidium bromida, es, nuclease freewater, *loading dye*, *Benchtop 1k+ DNALadder* (*Invitrogen*, G7541), *Go Green TaqMaster Mix* (*Promega*, M7122). Digunakan tiga primer yaitu primer spesifik ILY-2 (Setiyo, 2005), primer SSR FR-3300 dan FR-1753 (Billotteet al, 2010). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet (*Eppendorf Researchplus*), vorteks (*Biosan Basic Plus V-1*), *centrifuge* (*Tomy MX Series*), komputer, nanospektrometer (*Eppendorf Biospectrometer*), timbangan analitik, cetakan agarose, bak elektroforesis, *powersupply*, *thermal cycler* (*Mastercycler nexus*), *UVTransilluminator* dan *Gel documentation* (*UVITEC Cambridge 20 UV*).

Proses amplifikasi PCR seluruh sampel menggunakan *thermal cycler* dengan tahapan reaksi berdasarkan penelitian Putri et al (2007) dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil amplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarose 1,2 % selama 60 *Transilluminator* dan *Gel documentation*(*UVITEC Cambridge 20 UV*).

Proses amplifikasi PCR seluruh sampel menggunakan *thermal cycler* dengan tahapan reaksi berdasarkan penelitian Putri et al (2007) dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil amplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarose 1,2 % selama 60 menit pada 75 volt untuk primer ILY-2 dan 3% gel agarose selama 2 jam pada 60 Volt untuk primer FR-3300 dan primer FR-1753 kemudian divisualisasikan dengan *UV Transluminator*. Untuk penentuan keragaman genetik, produk PCR diskoring berdasarkan muncul tidaknya pita. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel. Keragaman alel ditentukan dari perbedaan migrasi alel pada gel dari masing-masing sampel. Berdasarkan ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan ke dalam data biner. Pita yang muncul diberi kode 1 (ada) dan 0 (tidak ada).

Data skoring kemudian diolah menggunakan software DARwin 6.0.13 dimana matriks jarak atau ketidaksamaan genetik untuk semua kombinasi pasangan individu dapat dilakukan dengan *Neighbor-Joining Tree* (NJTree) untuk memperoleh

Tabel 1. Proses amplifikasi PCR

Tahapan	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah siklus
Pre Denaturasi	94	2	1
Denaturasi	94	2	30-35
Annealing	54	1	30-35
Ekstensi	72	1	30-35
Ekstensi Akhir	72	10	1
Cooling	4	Unlimited	1

gambaran dari kekerabatan di antara individu-individu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identitas beberapa sampel yang diperoleh dari lapangan yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2. Elektroforegram produk PCR pada Gambar 1 menunjukkan bahwa semua sampel teramplifikasi menggunakan primer ILY-2, pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa 3 sampel tidak teramplifikasi pada primer FR-3300 yaitu pada sampel 7D, 20D, 27 B. Pada Gambar 3 dapat dilihat pada primer FR-1753 terdapat 6 sampel yang tidak teramplifikasi yaitu sampel 7D, 8D, 10D, 8B, 10B, 12B. Adanya sampel yang tidak terampifikasi diduga karena masih adanya polisakarida pada DNA stok sampel. yang menurut pernyataan Wilkins dan Smart (1996) mengatakan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Struktur polisakarida Tabel 2. Daftar sampel

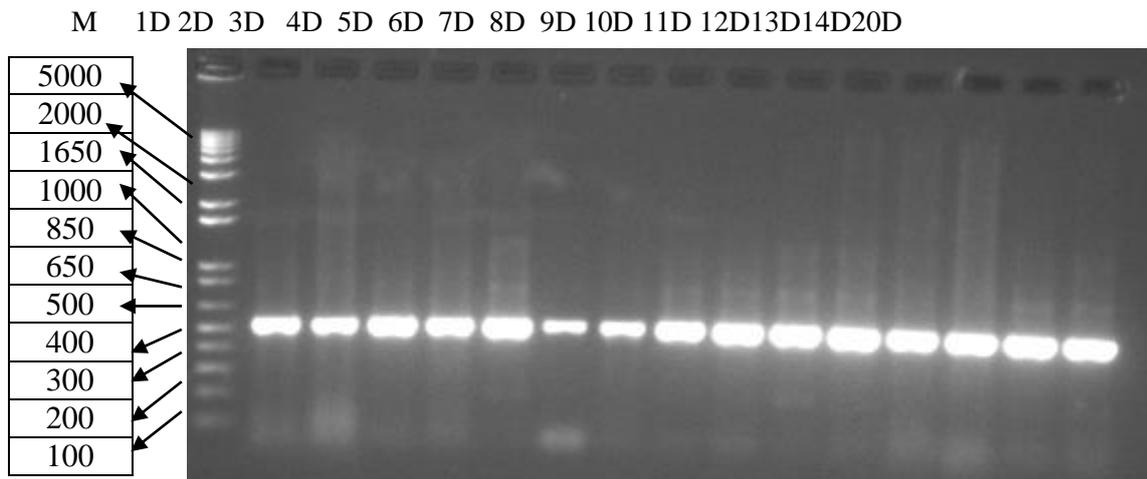
Kode Sampel	Origin	Jenis Buah	Tahun Tanam	Bentuk Sampel yang diisolasi
1	LAME	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun
2	LAME	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
3	LAME	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
4	LAME	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
5	KAMERUN	<i>Nigrescens</i>	2009	Daun/Buah
6	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Daun
7	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Daun
8	KAMERUN	<i>Nigrescens</i>	2009	Daun/Buah
9	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Daun
10	KAMERUN	<i>Nigrescens</i>	2009	Daun/Buah
11	YANGAMBI	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
12	YANGAMBI	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
13	YANGAMBI	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
14	YANGAMBI	<i>Nigrescens</i>	2006	Daun/Buah
20	WA	<i>Nigrescens</i>	2005	Daun/Buah
22	WA	<i>Nigrescens</i>	2005	Daun/Buah
24	WA	<i>Nigrescens</i>	2005	Daun/Buah
26	ANGOLA	<i>Nigrescens</i>	2012	Daun/Buah
27	ANGOLA	<i>Nigrescens</i>	2012	Daun/Buah
29	ANGOLA	<i>Nigrescens</i>	2012	Daun/Buah

yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat. Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa 3 sampel tidak teramplifikasi pada primer FR-3300 yaitu pada sampel 7D, 20D, 27 B. Pada Gambar 3 dapat dilihat pada primer FR-1753 terdapat 6 sampel yang tidak teramplifikasi yaitu sampel 7D, 8D, 10D, 8B, 10B, 12B. Adanya sampel yang tidak teramplifikasi diduga karena masih adanya polisakarida pada DNA stok sampel. yang menurut pernyataan Wilkins dan Smart (1996) mengatakan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida dan metabolit sekunder. Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat.

Persentase pita polimorfik berkisar antara 67% sampai 100% dengan rata-rata 89% untuk semua primer. Jumlah pita tertinggi dan ukuran pasangan basa tertinggi yaitu 4 pita dengan ukuran sebesar 1324 bp terdapat pada primer ILY-2 sedangkan jumlah pola pita terendah dan ukuran pasang basa terendah terdapat pada primer FR 1753 dengan ukuran 127 bp.

Primer ILY-2 mampu menunjukkan amplifikasi pada 36 DNA origin kelapa sawit yang diuji. Pola pita bersifat heterozigot, jumlah pita sebanyak 3 dengan ukuran pita sekitar 472 bp, 752 bp dan 1324 bp. Visualisasi primer ILY-2 dapat dilihat pada Gambar 1. Persentase pita polimorfis sebesar 67% dan persentase pita monomorfis sebesar 33%.

Primer FR-3300 mampu menunjukkan amplifikasi pada 33 DNA klon kelapa sawit yang diuji. Pola pita bersifat heterozigot, jumlah pita sebanyak 6 dan ukuran pita sekitar 186 bp, 213bp, 233 bp, 248 bp, 383 bp dan 410 bp. Persentase polimorfis sebesar 100%.



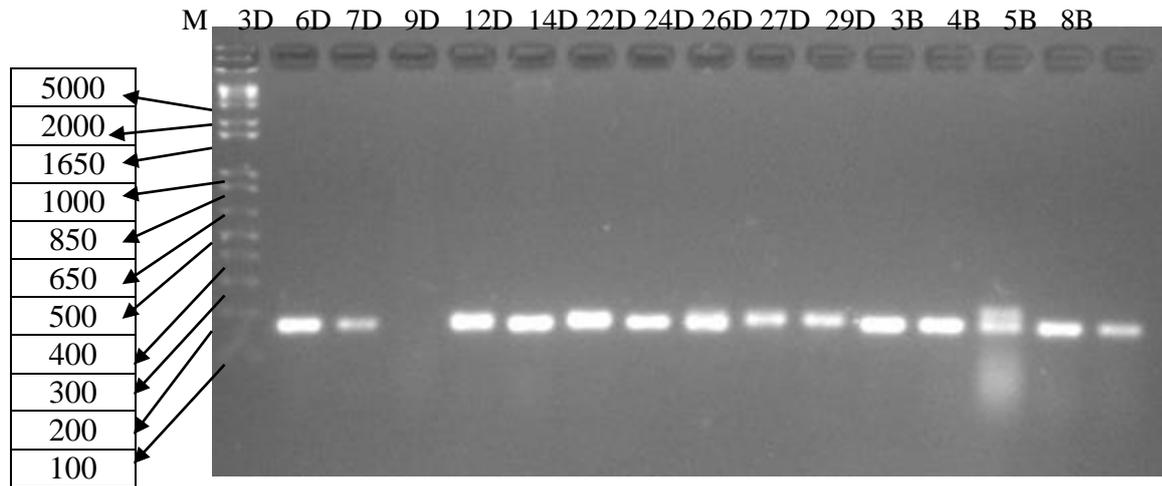
Gambar 1. Profil elektroforegram produk PCR Primer ILY-2 pada beberapa sampel kelapa sawit

Keterangan:

M = DNA ladder 1 kb plus (Invitrogen)

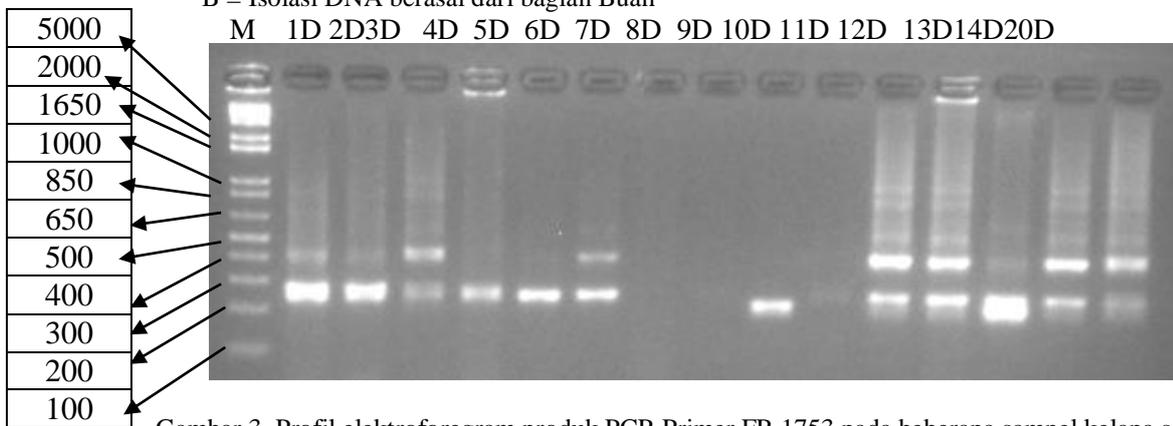
D = Isolasi DNA berasal dari bagian Daun

B = Isolasi DNA berasal dari bagian Buah



Gambar 2. Profil elektroforegram produk PCR Primer FR 3300 pada beberapa sampel kelapa sawit
 Keterangan:

M = DNA ladder 1 kb plus (Invitrogen)
 D = Isolasi DNA berasal dari bagian Daun
 B = Isolasi DNA berasal dari bagian Buah

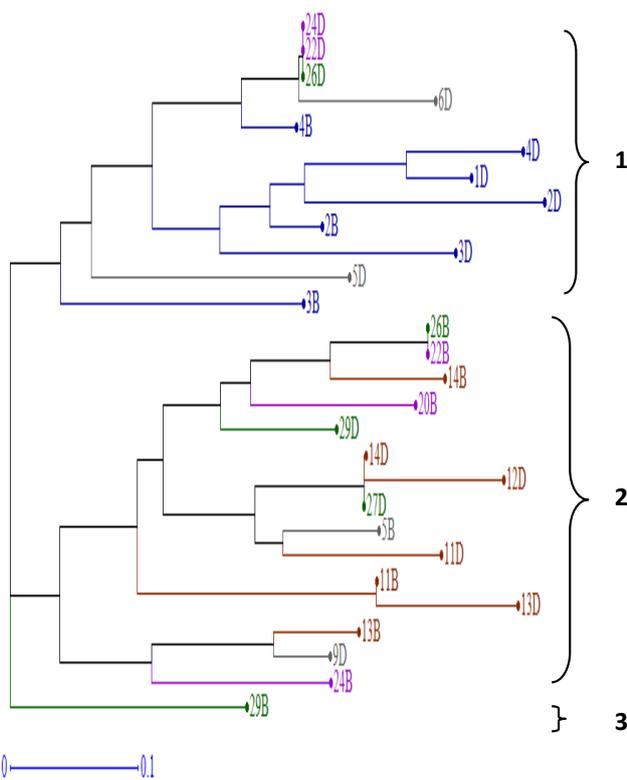


Gambar 3. Profil elektroforegram produk PCR Primer FR 1753 pada beberapa sampel kelapa sawit

Keterangan: M = DNA ladder 1 kb plus (Invitrogen)
 D = Isolasi DNA berasal dari bagian Daun
 B = Isolasi DNA berasal dari bagian Buah

Tabel 3. Persentase polimorfik

No.	Nama Primer	Ukuran Pita (bp)	Σ Pita	Σ Pita Polimorfik	Σ Pita Monomorfik	% Polimorfik
1.	ILY-2	472-1324	3	2	1	67%
2.	FR 3300	186-410	6	6	0	100%
3.	FR 1753	127-177	4	4	0	100%
	Total		13	12	1	267%
	Rata-Rata		4,3	4	0,3	89%



Gambar 4. Profil Filogenik dendrogram Neigbor-Joining dari 36 sampel DNA stok kelapa sawit berdasarkan *matrix dissimilarity simple matching* dengan menggunakan Primer ILY-2, FR-3300 dan FR-1753

Primer FR 1753 mampu menunjukkan amplifikasi pada 36 DNA origin kelapa sawit yang diuji. Pola pita bersifat heterozigot, jumlah pita sebanyak 4 dan ukuran pita sekitar 127 bp, 155 bp, 166 bp dan 177 bp. Persentase pita polimorfisme sebesar 100% dan persentase pita monomorfis sebesar 0%. Visualisasi primer FR-1753 dapat dilihat pada Gambar 3.

Analisis faktorial PCoA (*Principal Coordinates Analysis*) pada semua sampel melalui *software* DARwin 6.0.13 keragaman molekuler dari hasil analisis faktorial menunjukkan bahwa total keragaman molekuler pada aksis 1 sebesar 26,14% dan aksis 2 sebesar 14,61% dengan total keragaman molekuler sebesar 40,75%.

Gambar 4 memperlihatkan bahwa 36 sampel DNA terbagi menjadi 3 kelompok utama (*cluster*). Kelompok pertama (12 sampel) yang terdiri dari origin Lame (7 sampel), origin Kamerun (2 sampel), origin WA(2 sampel), origin Angola (1 sampel).

Kelompok kedua (19 sampel) yang terdiri dari origin Lame (1 sampel), origin Kamerun (2 sampel), origin Yangambi (7 sampel), origin WA (3 sampel), origin Angola (3 sampel). Kelompok ketiga (2 sampel) yang berasal dari origin Angola (2 sampel). Hasil analisis *Radial Neighbour-Joining Tree* (NJtree) dapat dilihat pada Gambar 4.

SIMPULAN

Produk PCR primer ILY-2 dan primer SSRFR-3300 dan FR-1753 menunjukkan pola pita (amplikon) yang beragam. Nilai keragaman dari 36 sampel ini sebesar 40,75% dengan analisis dendrogram menunjukkan terbagi menjadi 3 kelompok utama.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian dan Pendidikan Tinggi, sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Nomor : 017/SP2H/LT/DRPM/11/2016 atas bantuan biaya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Billotte, N., M.F. Jourjon, N. Marseillac, A. Berger, A. Flori, H. Asmady, B. Adon, R. Singh, B. Nouy, F. Potier, S.C. Cheah, W. Rohde, E. Ritter, B. Courtois, A. Charrier, B. Mangin. 2010. QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.* 120:1673-1687.

Direktorat Jenderal Perkebunan. 2016. Produksi dan volume ekspor-impor perkebunan besar Indonesia. Diakses dari <http://dirjenbun.deptan.go.id> pada Oktober 2016

Pandin, D.S. 2010. Keragaman genetik kelapa Dalam Tenga (DTA) dan Dalam Mapanget (DMT) berdasarkan penanda RAPD. *Buletin Palma No.16*

- Putri, L. A. P., Muhdi, Meiriani, dan S.Diana. 2007. Desain primer spesifik untuk gen yang berperan pada biosintesis beta karoten kelapa sawit. *Agrista*. 11 (2): 73 – 80.
- Putri, L. A. P. 2010. Pendugaan Parameter Genetik dan Karakterisasi Molekuler Keragaman Genetik dengan Marka Mikrosatelit (SSR) pada Kelapa Sawit.[Disertasi]. Program Pascasarjana IPB.Bogor.
- Putri, L. A. P., M. Basyuni, dan E. S. Bayu. 2016. Pengembangan, peningkatan mutu genetik dan produksi bahan tanaman kelapa sawit unggul berbasis aplikasi teknologi genomik. *Laporan Tahunan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Sumatera Utara*. 91 Hal.
- Rajanaidu, N. and B.S. Jalani.2000. World-wide performance of DxP planting materials and future prospects . Proc. 20PORIM Natl. Oil Palm Conference:Technologies in Plantation
- Setiyo, I. E. 2005. Perbaikan genetik komponen asam lemak kelapa sawit melalui seleksi berbantuan marka molekuler (*Marker Assited Selection*). *Laporan Kemajuan Tahap I Riset Unggulan Terpadu (RUT) Kementrian Riset dan Teknologi dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia* . 42 Hal.
- Suryanto D. 2003. Melihat keanekaragaman organisme melalui beberapa teknik genetika molekuler . USU Digital Library [terhubung berkala]. <http://www.library.usu.ac.id/modules.php> [09 Oktober 2016].
- Wilkins, T.A. dan Smart, L.B.. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue. Di dalam: Krieg, P.A. (ed). *A Laboratory Guide to RNA. Isolation, Analysis and Synthesis*. New York: Wiley – Liss