

## EVALUASI KERAGAMAN GENETIK TANAMAN KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq.) DI KEBUN PERCOBAAN PPKS BERDASARKAN PRIMER SSR (*Simple Sequence Repeats*)

*Genetic Diversity Evaluation of Oil Palm (Elaeis guineensis Jacq.) on Trial Garden of PPKS  
Based on Primer SSR (Simple Sequence Repeats)*

**Riski Aulia, Luthfi Aziz Mahmud Siregar\*, Eva Sartini Bayu, Retno Diah Setiowati**

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155

\*Corresponding author : Riskiauliabudiman@gmail.com

### ABSTRACT

*This research aimed to obtain information of genetic diversity populations of E. guineensis using SSR markers. This research was conducted in Biology Molecular Laboratory, Indonesian Oil Palm Research Institute, Marihat, Pematangsiantar, North Sumatera from March 2016 to November 2016. A total of 100 palm oil samples used in this research, including 20 samples from the populations of E. guineensis TR01S, including 20 samples from the populations of E. guineensis BJ022S, including 20 samples from the populations of E. guineensis BJ42S, including 20 samples from the populations of E. guineensis BO52S, and including 20 samples from the populations of E. guineensis MA19S. Calculation and Descriptive analysis in this research using software GeneMarker® version 2.40, software Power Marker V3.25, software NTSys version 2.1.1a and Microsoft Excell 2007. Research shows that the number of banding patterns detected 104 The banding patterns WITH range 8,7 per primary banding pattern, and the size of the banding patterns ranging from 101 bp -328 bp. mEgCIR2569 primary is the most widely primer to amplify DNA, the average of the percentage of polymorphism in the primer being used by 71% and the average value of . polymorficinformati content(PIC) 0,63. At 77% genetic similarity dendogram 100 samples split into 3 groups. Lowest genetic similarity value is 75% or the highest genetic diversity was 25%, while the value of the highest genetic similarity was 100% or the lowest genetic diversity is 0%.*

*Keywords : genetic diversity, oil palm of PPKS, SSR markers*

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi keragaman genetik populasi *E. guineensis* menggunakan marka SSR. Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Kelapa Sawit , Marihat, Pematangsiantar, Sumatera Utara pada bulan Maret 2016 s/d Januari 2017. Sebanyak 100 sampel dari tanaman kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 20 sampel dari populasi *E. guineensis* TR01S, 20 sampel dari *E. guineensis* BJ022S, 20 sampel dari populasi *E. guineensis* BJ42S, 20 sampel populasi *E. guineensis* BO52S, dan 20 sampel dari populasi *E. guineensis* MA19S. Perhitungan dan analisis deskriptif pada penelitian ini menggunakan *software* GeneMarker®*version* 2.40, *software* Power Marker V3.25, *software* NTSys *version* 2.1.1a, dan Microsoft Excell 2007. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total pola pita yang dideteksi sebanyak 104 pola pita dengan kisaran 8,7 pola pita per primer, dan ukuran pola pita berkisar 101 bp–328 bp. Primer mEgCIR2569 merupakan primer yang paling banyak mengamplifikasi DNA, rata-rata dari persentase polimorfisme pada primer yang digunakan sebesar 71% dan rata-rata nilai *polymorficinformati* content(PIC)0,63. Pada kesamaan genetik 77% dendogram membagi 100 sampel menjadi 3 kelompok. Nilai kesamaan genetik terendah 75% atau keragaman genetik tertinggi 25%, sedangkan nilai kesamaan genetik tertinggi 100% atau keragaman genetik terendah 0%.

Kata kunci : keragaman Genetik, tanaman kelapa sawit PPKS, primer SSR

## PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang penting dan strategis dalam mendukung peningkatan penambahandevisa negara Indonesia. Tanaman ini merupakan tanaman penghasil minyak sayur utama dunia (39.9%) selain kedelai (26.6%), kanola (14.9%), biji bunga matahari (8.8%) dan beberapa komoditi lainnya (USDA,2014). Walaupun kelapa sawit hanya ditanam pada areal sekitar 5% dari total areal tanaman penghasil minyak nabati dunia, tetapi kelapa sawit mampu menghasilkan sekitar 33% dari total produksi minyak nabati dunia dan menghasilkan sekitar 45% dari total produksi minyak makan dunia(Singh *et al.*, 2013 & Pootakham *et al.*, 2015). Dengan demikian kelapa sawit diharapkan mampu memenuhi pertumbuhan permintaan minyak nabati dunia dalam jumlah besar dengan volume permintaan yang diperkirakan mencapai 240 juta ton minyak nabati pada tahun 2050 (Corley, 2009).

Keberlanjutan produksi dan suplai produk kelapa sawit dunia perlu dipertahankan dengan pemuliaan yang lebih intensif melalui studi keragaman genetik untuk menjamin bahwa bahan tanam dengan produktivitas tinggi tersedia untuk dibudidayakan. Pemahaman mengenai keragaman genetik dan hubungan dengan materi plasma nutfah kelapa sawit sangat penting dalam menyeleksi materi bahan tanam unggul. Ketersediaan keragaman genetik dalam plasma nutfah sangat membantu meningkatkan efisiensi kegiatan pemuliaan yang mampu menghasilkan capaian seleksi yang diharapkan (Azrai, 2005). Keragaman genetik dapat menjadi informasi dalam konservasi, pemuliaan, pengelolaan dan pemanfaatan sumberdaya genetik tanaman secara berkelanjutan. Salah satu cara yang dapat digunakan untuk penilaian keragaman genetik adalah analisis DNA (Zulfahmi, 2013).

Pemuliaan tanaman kelapa sawit umumnya terkendala oleh masalah alamiah seperti lamanya siklus pemuliaan dan minimnya informasi genetik (Asmono, 1998). Keragaman genetik berbasis informasi agromorfologis untuk mengevaluasi keragaman genotipik, saat ini dirasakan sudah tidak memadai lagi. Integrasi marka molekuler ke dalam program pemuliaan kelapa sawit dapat digunakan untuk memecahkan problem-problem alamiah tersebut (Asmono *et al.*, 1999). Analisis berbasis marka sangat diperlukan untuk melihat sejauh mana hubungan genetik antar individu dalam populasi. Asmono *et al.* (2005) melaporkan bahwa informasi molekuler yang dihasilkan dapat digunakan sebagai dasar pemeliharaan material genetik untuk konservasi dan petunjuk untuk pemuliaan tanaman. Informasi kekerabatan genetik antar individu dan di antara spesies penting untuk perbaikan tanaman (Julisaniah *et al.*, 2008).

Mikrosatelit atau juga dikenal sebagai SSR (*Simple Sequence Repeat*), adalah utasan DNA yang terdiri atas beberapa kali pengulangan basa sepanjang 1 sampai 8 pasang (Bredemeijer *et al.*, 1998; Narvel *et al.*, 2000). Marka SSR saat ini masih merupakan marka yang paling populer digunakan dalam studi genetik dan pemuliaan karena berbagai keunggulannya, diantaranya lokasinya yang menyebar di seluruh genom tanaman,multialelik, dan mudah diamplifikasi dengan teknik PCR (Powel *et al.*,1996). Untuk kelapa sawit, marka SSR merupakan marka yang paling prospektif untuk menganalisis populasi dan mengetahui struktur genetik populasi kelapa sawit (Singh *et al.*, 2007). Peta genetik kelapa sawit berdasar marka SSR (Billotte *et al.* 2005). Marka SSR telah digunakan secara luas dalam analisis berbasis molekuler. Marka ini telah banyak digunakan pada berbagai studi keragaman genetik.

Tabel 1. Daftar populasi sampel penelitian

No	Populasi	Tipe	Jumlah Individu	Tahun Tanam
1	BO52S	Tenera	20	2003
2	BJ42S	Dura	20	2010
3	MA19S	Dura	20	2006
4	BJ22S	Tenera	20	1990
5	TR01S	Tenera	20	2002

Berdasarkan uraian diatas penulis tertarik untuk mengetahui informasi genetik populasi kelapa sawit *E. guineensis* yaitu populasi TR01S dan BJ022S mewakili populasi projeni, populasi BJ42S mewakili populasi liar yang diintroduksi dari kamerun, populasi BO52S mewakili populasi jantan dan populasi MA19S mewakili populasi betina pada kebun percobaan PPKS. Hal yang dapat dilakukan untuk mengetahui informasi genetik tersebut diantaranya adalah melakukan analisis hubungan genetic (dendrogram) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System* (NTS<sub>ys</sub>).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari Maret 2016 sampai dengan November 2016 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) Marihat, Pematangsiantar.

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun ujung tombak yang berwarna putih kuning kehijauan yang terdiri atas 100 sampel kelapa sawit dari 5 populasi kelapa sawit milik PPKS yaitu TR01S, BJ42S, BO52S, MA19S dan BJ22S dengan latar belakang genetik *E. guineensis*. Kelima populasi kelapa sawit *E. guineensis* tersebut yaitu BJ22S yang diperoleh dari Kebun percobaan PPKS di Bah Jambi PTPN IV, BJ42S diperoleh dari Kebun percobaan PPKS di Bah Jambi PTPN IV, TR01S diperoleh dari Kebun percobaan PPKS di Tanah Raja PTPN

III, BO52S yang diperoleh dari Kebun percobaan PPKS di Bah Jambi, dan MA19S yang diperoleh dari Kebun percobaan PPKS di Marihat.

### Pemilihan Pohon Pengamatan

Pengamatan fenotipik karakter kualitas tandan dilakukan pada 5 populasi *E. guineensis* yang ada pada kebun percobaan PPKS, pemilihan populasi ini didasarkan pada populasi-populasi yang mewakili populasi projeni, populasi liar, populasi tetua jantan, dan populasi tetua betina (Pengamatan fenotipik ini dilakukan oleh pihak PPKS). Adapun 2 dari 5 populasi yang digunakan pada penelitian ini merupakan *progeny test* dari varietas komersial yaitu populasi *E. guineensis* TR01S yang merupakan hasil persilangan dari T x D, dan populasi *E. guineensis* BJ022S yang merupakan hasil persilangan D x P. 3 populasi *E. guineensis* lainnya yaitu populasi *E. guineensis* BJ42S yang mewakili populasi liar merupakan introduksi dari kamerun, populasi *E. guineensis* BO52S merupakan populasi yang mewakili populasi jantan hasil persilangan antara T x D dan populasi *E. guineensis* MA19S merupakan populasi hasil selfing antara *E. guineensis* D x D. Sementara itu pemilihan sampel pada masing-masing populasi didasarkan kepada hasil analisis pada program pemuliaan siklus kedua yang memiliki karakter unggul seperti karakter mesokarp per buah (% M/F) dan minyak per mesokarp kering (% O/DM) yang diamati melalui analisis tandan dan soxhlet (analisis tandan dan soxhlet ini dilakukan oleh pihak PPKS). Setiap populasi dipilih masing-masing sebanyak 5 sampel yang mewakili nilai tertinggi dan sampel yang mewakili nilai terendah untuk mewakili karakter mesokarp per buah (%M/F) dan minyak per mesokarp kering (%O/DM). Pohon yang dipilih adalah pohon yang sehat dengan pertumbuhan yang normal.

Tabel 2. Primer SSR yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Primer	Forward sequence	Reverse sequence
1	mEgCIR0783	GAATGTGGCTGTAAATGCTGAGTG	AAGCCGCATGGACAACCTCTAGTAA
2	mEgCIR0782	CGTTCATCCCACCACCTTTC	GCTGCGAGGCCACTGATAC
3	mEgCIR2224	TGGGGATGGGGGAGCAG	TCGCACCGCCTCCTACC
4	mEgCIR3413	AAAGCTATGGGGTGAAAGAT	TGGATAAGGGCGAGAAGAGA
5	mEgCIR2569	TAGCCGCACTCCACGAAGC	CCAGAATCATCAGACTCGGACAG
6	mEgCIR3213	GCTCTTTGTATTTCTGGTTC	AGCAGCAAACCCTACTAACT
7	mEgCIR3400	CAATTCCAGCGTCACTATAG	AGTGGCAGTGGAAAAACAGT
8	mEgCIR3433	GGTTCAATGGCATAACAT	GTTCAAGGTGCAGGTTAA
9	mEgCIR3555	CATCAGAGCCTTCAAACACTAC	AGCCTGAATTGCCTCTC
10	mEgCIR3691	GCATCATTGGACTATCATAACC	TTGTGAACCAGGGAACACTATC
11	mEgCIR3705	CCACCATGCAGAATAGTAAG	GTGTGCCCTCAAAAAGTATG
12	mEgCIR3775	TCTTGATATTTAAAAGGTCAGGAGAA	CGTTCCTTTTTCCATAGAT

### Pengambilan Sampel Daun

Daun tanaman kelapa sawit yang digunakan adalah daun yang masih berbentuk tombak dan berwarna putih kekuning-kuningan kehijauan atau pelepah daun pertama (75% membuka) sebanyak 50 mg jaringan daun tanaman kelapa sawit *E.guineensis*. Daun diambil pada bagian tengah. Daun dan gunting dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol yang disemprotkan pada tisu lalu daun digunting masing-masing sepanjang  $\pm 5$  cm dari bagian tengah daun. Kemudian daun dimasukkan pada kantong plastik yang telah diberi label identitas.

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan 50 mg jaringan daun tanaman

### Amplifikasi Marka Molekuler

DNA tiap sampel individu dengan konsentrasi 10 ng/ $\mu$ l digunakan dalam PCR-SSR menggunakan 12 marka SSR. Proses amplifikasi SSR mengacu pada protokol yang diuraikan oleh Wening dan Yenni (2013) yang ditambahkan sekuen primer universal M13(6-FAM, HEX, ROX dan NED) (*Sigma*) yang telah berlabel fluoresen. Banyaknya *master mix* disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan diamplifikasi. Untuk satu kali reaksi PCR dengan volume akhir 10  $\mu$ l dibutuhkan 1  $\mu$ l DNA sampel, 7  $\mu$ l *ddH<sub>2</sub>O*, 1  $\mu$ l *NH<sub>4</sub> Reaction Buffer* (*Bioline*), 0,3  $\mu$ l *MgCl<sub>2</sub>* (*Bioline*), 0,2  $\mu$ l *dNTP Mix*

kelapa sawit *E. guineensis* yang telah diperoleh dari pengambilan sampel daun. Protokol ekstraksi DNA mengacu pada Wening (2014) dengan menggunakan *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant)* milik Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS). Setelah DNA murni diperoleh dari hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam *tube* yang disusun di dalam *collection tube* kemudian disimpan dalam freezer dengan suhu 2<sup>0</sup>C.

### Pemilihan Marka SSR

Sebanyak 12 pasang primer SSR yang digunakan pada penelitian ini adalah primer yang telah diuji dan dipublikasikan oleh Wening dari peta Billote (peta genetik kelapa sawit).

(*Promega*), 0,05  $\mu$ l *Primer Forward* (*Sigma dan 1<sup>st</sup> Base*), 0,2  $\mu$ l *Primer Reverse* (*Sigma dan 1<sup>st</sup> Base*), 0,05  $\mu$ l *Taq DNA Polymerase* (*invitrogen*) yang dilarutkan pada plate PCR (*hard shell 96 well PCR Plate (USA-1st Base)*). Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *PCR BIO-RAD (CFX96 Real Time System)*.

### Visualisasi Hasil Amplifikasi

Visualisasi DNA dari hasil amplifikasi dengan metode PCR dapat diketahui melalui elektroforesis *gell agarose*. Visualisasi hasil amplifikasi PCR dilakukan dengan konsentrasi agaros sebanyak 3 % dari 80 ml

buffer TAE. Maka agaros diperoleh sebanyak ke dalam 80 mL 1x TAE lalu diletakkan pada *beaker glass* dilengkapi dengan *magnetic stirrer* didalamnya, kemudian dihomogenkan menggunakan *Hot Plate* dengan suhu 280°C dan dengan stire pada angka 6 biarkan ± 20 menit hingga larutan homogen dan berwarna bening, lalu angkat dan letakkan pada cetakan agar (*chamber*) pada sisi cetakan diletakkan sisir (*chomb*) cetakan sumur telah diseimbangkan dengan *waterpashe* diamkan selama ±30 menit hingga larutan memadat. Larutan TAE 1x dituang ke dalam wadah (tangki) elektroforesis lalu letakkan *tray* agar pada bak elektroforesis sehingga gel agarosa terendam setinggi 1-2 mm. DNA contoh yg telah disiapkan sebanyak 10 µl dengan komposisi DNA sebanyak 1 µl, mix PCR sebanyak 7 µl, dan go taq sebanyak 2 µl dimasukkan ke dalam sumur gel dalam *tank* elektroforesis. Sebagai kontrol elektroforesis digunakan 1 kb *Plus DNA ladder* sebanyak 10 µl pada salah satu sumur agaros. Alat elektroforesis disambungkan dengan tegangan 50 volt, 400 mA selama 60 menit. Sehingga produk DNA akan bergerak dari kutub positif ke kutub negatif.

Setelah *running* elektroforesis, *gell agarose* hasil elektroforesis diwarnai (*staining*) dengan cara merendamnya pada larutan *gell red* 5 µg/l selama 1 jam, kemudian dilakukan pencucian (*destaining*) dengan cara merendamnya didalam larutan aquades selama 5 menit. Pita DNA divisualisasikan menggunakan UV *transumilator* dan didokumentasikan dengan kamera. Hasil PCR dinyatakan positif apabila hasil visualisasi dengan elektroforesis menunjukkan pola pita yang terang dan fokus, artinya DNA yang dihasilkan cukup solid, dan utuh.

### Analisis Fragmen DNA

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR-SSR dianalisis menggunakan *capillary sequencer* (analisis fragmen dengan *capillary sequencer* dilakukan oleh jasa komersial 1<sup>st</sup>Base (Malaysia).

Dari hasil analisis fragmen menggunakan *cappillary sequencer* yang dilakukan oleh jasa komersial 1<sup>st</sup>BASE

2,4 gram lalu ditambahkan dianalisis menggunakan *software GeneMarker version 2.40 demo version (Soft Genetic LLC®)* (analisis *software GeneMarker* dilakukan oleh pihak PPKS).

### Analisis Data

Analisis data molekuler dilakukan dengan skoring pita DNA. Setiap pita yang muncul dari *output software GeneMarker* diasumsikan sebagai alel SSR. Alel tersebut diterjemahkan menjadi data biner yang diberikan nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel (Hairinsyah, 2010). Nilai satu atau (+) akan diberikan apabila terdapat alel, dan nilai 0 atau (-) bila tidak terdapat alel.

Analisis persentase pita polimorfis dihitung untuk melihat berapa persen pita polimorfisme yang terbentuk di setiap primer yang digunakan. Untuk menghitung persentase pita polimorfis, digunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ pita polimorfik} = \frac{\sum \text{Lokus polimorfik}}{\sum \text{Lokus semuanya}} \times 100\%$$

Analisis nilai *polymorphic information content* (PIC) menggunakan perangkat lunak Power Marker V3.25 (Liu dan Muse, 2005). Analisis hubungan genetic (dendrogram) dikonstruksi berdasarkan nilai kemiripan masing-masing sampel yang dihasilkan melalui prosedur *similarity of qualitative data* (SIMQUAL) dengan koefisien kemiripan *simple matching* (SM) dan analisis *Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested Clustering* (SAHN) menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System* (NTSsys) versi 2.1.1a (Rohlf 2003).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Visualisasi Hasil Amplifikasi

Visualisasi hasil amplifikasi dengan menggunakan elektroforesis agaros dilakukan pada beberapa DNA hasil amplifikasi PCR-SSR. DNA yang divisualisasikan merupakan DNA hasil amplifikasi yang dipilih secara acak sehingga mewakili 100 DNA hasil amplifikasi pada masing-masing primer. Jumlah DNA hasil

amplifikasi yang divisualisasikan berjumlah 3-4 DNA pada masing-masing primer. mengamplifikasi DNA sehingga DNA yang sudah diamplifikasi dapat dianalisis lebih lanjut dengan *cappillary sequencer* oleh 1<sup>st</sup> BASE Malaysia .

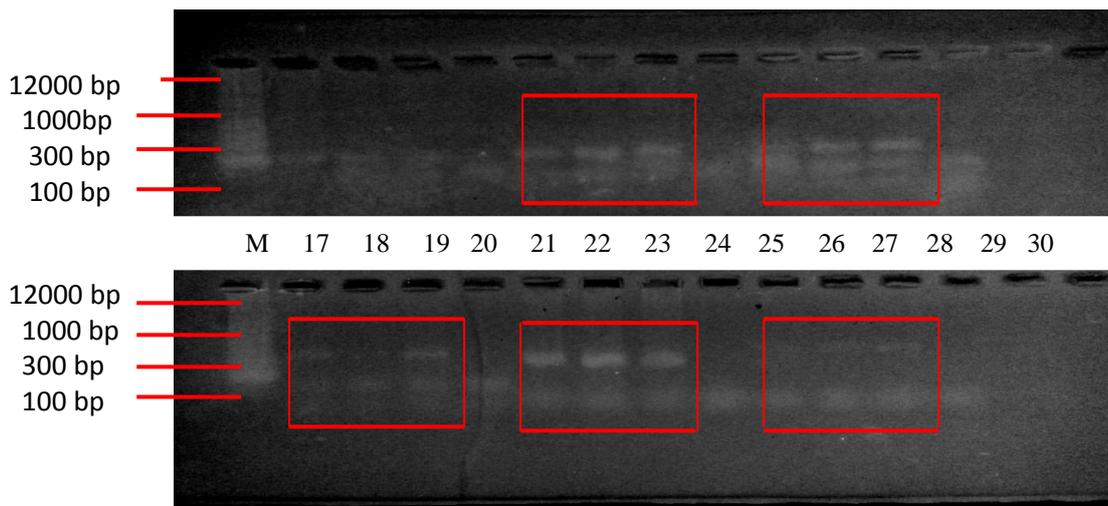
Visualisasi dengan elektroforesis merupakan metode yang digunakan untuk melihat teramplifikasi atau tidaknya DNA oleh 12 primer yang digunakan. Dari Gambar 1 dapat diketahui gambaran secara umum bahwa dari 38 sampel yang diuji menunjukkan keberadaan pita DNA namun, ada beberapa sampel yang menunjukkan *smear*. Beberapa sampel yang *smear* ini menyebabkan pita DNA terlihat tidak jelas dan tebal. Pita *smear* ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah konsentrasi DNA yang terlalu rendah, pemurnian yang kurang maksimal pada saat ekstraksi juga bisa berpengaruh terhadap sebagian supernatan yang mengandung DNA yang diisolasi terbuang, kontaminasi pada saat isolasi DNA tersebut bisa terjadi karena polisakarida, protein, metabolit sekunder dan lipid selain itu karena adanya ketidak sesuaian primer. Beberapa faktor penting ini berpotensi besar menyebabkan beberapa pita DNA amplifikasi yang divisualisasikan menggunakan elektroforesis agaros menjadi *smear*. Hal ini sesuai dengan Weeden *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa cetakan DNA yang mengandung senyawa-senyawa seperti polisakarida dan senyawa fenolik, serta konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi

Visualisasi ini bertujuan untuk melihat gambaran keberhasilan primer yang redup atau tidak jelas. Menurut Haris *et al.* (2003), konsentrasi DNA akan berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah akan menghasilkan fragmen yang sangat tipis pada gel atau bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga sulit dibedakan antara satu fragmen dengan fragmen lainnya. Selain itu menurut Restu *et al.* (2012) pemurnian yang kurang maksimal menyebabkan sebagian supernatan yang mengandung DNA genom dapat ikut terbuang sehingga konsentrasi DNA yang dihasilkan menjadi berkurang. Perbedaan hasil pada masing-masing sampel tergantung pada banyaknya konsentrasi DNA yang terekstraksi. Semakin sedikit atau tidak adanya *smear* pada pita DNA menunjukkan semakin baik kualitas DNA.

#### **Profil Pita 12 Marka SSR pada 100 Sampel Kelapa Sawit**

Pada tabel 4, dapat dilihat bahwa terdapat sebanyak 104 pola pita yang dihasilkan oleh 12 primer SSR yang digunakan pada penelitian ini. Rata-rata pita yang dihasilkan berkisar 8,7 pola pita per primer. Jumlah pola pita terbanyak ditemui pada primer mEgCIR2569 sebanyak 15 pola pita dan jumlah pola pita terendah sebanyak 4 pada primer mEgCIR3705.

M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Gambar 1. Visualisasi Amplifikasi sampel DNA *E. guineensis* primer mEgCIR3691 pada sumur gel 6-8, primemEgCIR3433 pada sumur gel 10-12, primer mEgCIR3400 pada sumur gel 17-19, primer mEgCIR3555 pada sumur gel 21-23 dan primer mEgCIR2224 pada sumur gel 25-27.

Keterangan: M= 1 kb plus DNA ladder.

Tabel 4. Ukuran dan total pola pita, jumlah DNA teramplifikasi dan tidak teramplifikasi, persentase polimorfisme serta nilai PIC dari 100 sampel yang di analisis menggunakan 12 primer SSR.

No	Primer	Ukuran Pita (bp)	Total Pola Pita	Jumlah DNA		Jumlah Pita		Persentase Polimorfisme	Niliai PIC
				Teramplifikasi	Tidak Teramplifikasi	Polimorfik	Monomorfik		
1	mEgCIR2569	237-260	15	99	1	91	8	92%	0,82
2	mEgCIR3705	101-108	4	90	10	6	84	7%	0,15
3	mEgCIR0782	170-200	10	92	8	34	58	37%	0,65
4	mEgCIR3691	197-212	8	94	6	71	23	76%	0,66
5	mEgCIR3433	258-270	8	86	14	72	14	84%	0,73
6	mEgCIR3400	156-178	9	91	9	55	36	60%	0,58
7	mEgCIR3555	138-158	10	90	10	86	4	96%	0,66
8	mEgCIR2224	118-125	7	94	6	92	2	98%	0,61
9	mEgCIR3775	197-208	9	64	46	64	0	100%	0,71
10	mEgCIR0783	307-328	11	87	13	55	32	63%	0,71
11	mEgCIR2347	161-175	6	90	10	75	15	83%	0,72
12	mEgCIR3213	103-117	7	91	9	57	34	63%	0,57
Total			104	1068	142	758	310	858%	7,57
Rata-Rata			8,7	89	11,83	63,17	25,83	71%	0,63

Keterangan: PIC (*Polymorphic Information Content*).

Tabel 4 menunjukkan bahwa ukuran pita yang muncul pada 12 primer yang digunakan berbeda-beda. 12 primer tersebut menunjukkan pola dan ukuran pita yang berbeda. Terdapat sebanyak 104 pola pita dengan rata-rata 9 pita pada masing-masing primer. Ukuran pita berkisar 101-328 bp. Jumlah pola pita terbanyak ditemui pada

primer mEgCIR2569 sebanyak 15 pola pita dan terendah pada primer mEgCIR3705 sebanyak 4 pola pita. Ukuran pola pita yang beragam ini disebabkan oleh jumlah kopi yang diamplifikasi mewakili satu pita tidak sama selain itu juga disebabkan perbedaan urutan basa nukleotida dan interaksi antara 12 primer yang digunakan dengan DNA cetakan.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Setiyo (2000) yang menyatakan bahwa adanya pita-pita DNA yang bervariasi dalam intensitasnya ini dapat terjadi karena jumlah kopi yang di amplifikasi mewakili suatu pita tidak sama. Selain itu perbedaan jumlah pita yang dihasilkan setiap primer disebabkan perbedaan urutan basa nukleotida primer atau interaksi antara primer dan DNA cetakan. Pita DNA yang terletak pada pasang basa (bp) yang sama menunjukkan bahwa pita DNA tersebut mempunyai migrasi yang sama dan diasumsikan sebagai lokus yang homolog.

Pada Tabel 4 menunjukkan bahwa dari 100 sampel yang dianalisis terdapat 1068 DNA yang berhasil teramplifikasi oleh 12 primer yang digunakan namun tidak seluruhnya teramplifikasi oleh 12 primer SSR yang digunakan pada penelitian ini, karena jumlah DNA yang tidak teramplifikasi secara keseluruhan terdapat sebanyak 142 DNA. Primer mEgCIR2569 mampu mengamplifikasi DNA terbanyak dengan jumlah 99 DNA teramplifikasi sementara DNA yang jumlahnya paling sedikit teramplifikasi sebanyak 46 DNA pada primer mEgCIR3775. Primer mEgCIR2569 dan primer lain yang berhasil mengamplifikasi DNA sampel menunjukkan bahwa urutan basa nukleotida antara DNA cetakan dengan primer yang digunakan sesuai (*match*), sehingga basa nukleotida pada DNA menempel pada sekuen target. DNA yang tidak teramplifikasi pada 12 primer disebabkan oleh basa nukleotida yang tidak menempel pada sekuen target dan diduga primer tidak sesuai dengan DNA cetakan. Hal ini sesuai dengan Ariani (2014) yang menyatakan bahwa basa nukleotida hanya akan menempel pada sekuen target. Selain itu menurut Williams *et al.* (1990) fragmen yang tidak muncul disebabkan tidak terjadinya amplifikasi, mungkin terjadi karena primer yang digunakan tidak sesuai dengan DNA cetakan. Beberapa bukti percobaan menunjukkan bahwa perbedaan satu pasang basa saja cukup menyebabkan ketidaksesuaian cetakan primer yang kemudian mencegah amplifikasi.

Persentase polimorfis masing-masing primer sebesar 7%-100%. Persentase polimorfis terendah yaitu 7% ditemui pada primer mEgCIR3705 sementara persentase polimorfis tertinggi yaitu 100% diperoleh dari primer mEgCIR3775. Rata-rata persentase polimorfis pada 12 primer sebesar 71%. Dari persentase polimorfisme yang diperoleh memperlihatkan variasi genetik yang tinggi dari 100 sampel yang diuji dengan 12 primer SSR. Nilai polimorfisme ditentukan oleh frekuensi kemunculan alel. Persentase polimorfis yang cukup tinggi membuktikan bahwa marka SSR bersifat kodominan sehingga tingkat heterozigositasnya tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Afifah (2012) yang menyatakan bahwa kelebihan marka SSR yaitu bersifat kodominan sehingga tingkat heterozigositasnya tinggi yang berarti memiliki daya pembeda antar individu sangat tinggi serta dapat diketahui lokasinya pada DNA sehingga dapat mendeteksi keragaman alel pada level yang tinggi, mudah dan ekonomis. SSR memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi stabil secara somatik. Yusuf (2010) menyatakan bahwa variasi genetik dilihat dari perbedaan jumlah fragmen, ukuran fragmen dan jumlah pitapolimorfik.

Nilai PIC pada penelitian ini dinilai sangat informatif dengan rata-rata PIC pada ke 12 primer yg digunakan sebesar (0,63). Dari 12 primer yang digunakan ada 11 primer yang dinyatakan sangat informatif karena memiliki nilai  $PIC > 0,5$ . Sementara itu primer mEgCIR3705 dinyatakan kurang informatif karena memiliki nilai PIC 0,15 ( $< 0,25$ ). Nilai PIC diklasifikasikan menjadi tiga kelas, yaitu  $PIC > 0,5$  sebagai sangat informatif,  $0,25 > PIC > 0,5$  sebagai moderat informatif dan  $PIC < 0,25$  sebagai kurang informatif (Botstein *et al.*, 1980).

Analisis PCR 12 primer SSR menggunakan 100 sampel kelapa sawit menunjukkan tingkat polimorfis yang tinggi dengan rata-rata nilai *polymorphism information content* (PIC) 0,63. Nilai PIC 0,63 pada analisis ini lebih tinggi dibandingkan dengan Ajambanget *al.* (2012) sebesar 0,60 yang menganalisis plasma nutfah asal Kamerun dan lebih rendah jika dibandingkan hasil (2009)

pada keragaman genetic kelapa sawit Pisifera

asal Nigeria, yaitu sebesar 0,68.

### **Analisis Hubungan Genetik**

Dari data biner hasil skoring amplifikasi 12 primer yang diolah dengan *software* NTSys dihasilkan dendogram yang menunjukkan kekerabatan 100 sampel dari 5 populasi *E. guineensis* di kebun percobaan PPKS. Pada Gambar 3 Populasi TR01S ditandai dengan kode analisis (TR01S001-TR01S020), populasi BJ22S ditandai dengan kode analisis (BJ22S007-BJ22S026), populasi BJ42S ditandai dengan kode analisis (BJ42S009-BJ42S029), populasi BO52S ditandai dengan kode analisis (BJ42S009-BJ42S028), dan populasi MA19S ditandai dengan kode analisis (MA19S001-MA19S020) (Gambar 3).

Pada nilai kesamaan genetik sebesar 77% kelompok A terdiri dari 2 sampel yaitu BJ42009 dan BJ42024. Kelompok B pada terdiri dari 96 sampel yang terbagi menjadi 2 subkelompok (subkelompok 2.1 dan subkelompok 2.2), subkelompok 2.1 terbagi menjadi 2 kelompok kecil lagi (subkelompok 2.1.1 dan subkelompok 2.1.2), subkelompok 2.1.1 terdiri dari 91 sampel yang terbagi menjadi 2 subkelompok lagi (Subkelompok 2.1.1.1 dan subkelompok 2.1.1.2), subkelompok 2.1.1.1 terdiri dari 84 sampel dan subkelompok 2.1.1.2 terdiri dari 7 sampel. Sementara itu subkelompok 2.1.2 hanya terdiri dari 1 sampel yaitu BJ42S018. Subkelompok 2.2 pada koefisien kesamaan genetik terdiri dari 4 sampel yaitu BJ42S019, BJ42S022, BJ42S029, dan BJ42S026. Kelompok C pada koefisien kesamaan genetik hanya terdiri dari 2 sampel yaitu BJ42S020 dan BJ42S027 (Gambar 3).



Gambar2. Dendrogram kekerabatan 100 sampel dari 5 populasi kelapa sawit di PPKS menggunakan 12 marka SSR hasil analisis kluster dengan metode UPGMA

Pada Gambar 2, 100 sampel *E. guineensis* yang diamati menghasilkan nilai koefisien kemiripan genetik berkisar antara 75%-100%. Hal ini menunjukkan bahwa keragaman genetik sampel *E. guineensis* berdasarkan marka SSR adalah berkisar antara 0 % sampai 25% (25%), nilai keragaman genetik yang dihasilkan cukup rendah (<50%). Keragaman genetik yang rendah ini disebabkan oleh sampel berasal dari spesies yang sama sehingga komposisi material genetiknya masih sangat dekat dan saling berhubungan. Pada koefisien kemiripan 75% sampel *E. guineensis* yang diamati terbagi menjadi dua kelompok (kelompok I dan II) dan pada koefisien 77% terbagi menjadi 3 kelompok kecil (kelompok A, B dan C) (Gambar 2).

Dibandingkan dengan beberapa penelitian serupa, terdapat perbedaan nilai kesamaan genetik. Penelitian Zulhermana (2009), menunjukkan nilai kesamaan genetik tanaman kelapa sawit sebesar 62-96%. Tasma dan Arumsari (2013) melaporkan nilai kemiripan genetik tanaman kelapa sawit kamerun berkisar antara 52,28-87,50%. Nilai kesamaan genetik pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian tersebut, yakni sebesar 75%-100%.

Pada kesamaan genetik 77,4% dendrogram membagi 100 sampel menjadi 3 kelompok. Kelompok A terdiri dari 2 sampel, kelompok B terdiri dari 96 sampel, dan kelompok C terdiri dari 2 sampel. Nilai kesamaan genetik terendah 75% atau keragaman tertinggi 25%, sedangkan nilai kesamaan genetik tertinggi 100% atau keragaman terendah 0%. Koefisien kesamaan genetik tertinggi ditemui pada nilai kesamaan genetik 100% pada sampel TR01S015 dengan TR01S016, MA19S008 dengan MA19S016 dan MA19S007 dengan MA19S0015, populasi TR01S merupakan populasi projeni *E. guineensis* tipe T hasil persilangan T x D dan populasi MA19S merupakan *E. guineensis* tipe D hasil *selfing* D x D, nilai kesamaan genetik 100% yang sama pada populasi TR01S dan MA19S mencerminkan bahwa memang sampel-sampel tersebut

berasal dari populasi yang sama sehingga hubungan kekerabatannya sangat dekat serta memiliki komposisi material genetik yang sama antar sampel pada masing-masing populasi sementara itu nilai kesamaan genetik terendah pada nilai 75% ditemui pada populasi BJ42S020 dengan BJ42S027 hal ini mengindikasikan bahwa populasi BJ42S memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi disebabkan populasi BJ42S merupakan populasi liar yang di introduksi dari kamerun.

## SIMPULAN

Dari 12 primer SSR yang diuji, total pola pita yang dideteksi sebanyak 104 pola pita dengan kisaran 8,7 pola pita per primer, dan ukuran pola pita berkisar 101 bp–328 bp dengan rata-rata persentase polimorfisme pada 12 primer SSR diperoleh 71% dan rata-rata PIC sebesar 0,63.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, E. N. 2012. Penggunaan Penanda Molekuler Untuk Mempercepat dan Mempermudah Perbaikan Kualitas Tanaman Teh (*Camelliasinensis* (L.) O. Kuntze). Makalah Seminar. UGM Press, Yogyakarta.
- Ajambang, W., Sudarsono, D. Asmono, N. Toruan. 2012. Microsatellite markers reveal Cameroon's wild oil palm population as a possible solution to broaden the genetic base in the Indonesia-Malaysia oil palm breeding programs. *Afr. J. Biotechnol.* 11:13244-13249.
- Ariani, S.H. 2014. Keragaman genetik aren Sulawesi Tenggara berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA. [Tesis]. Program Magister Agroekoteknologi. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Asmono, D. 1998. Pemanfaatan Marka Molekuler Untuk Mendukung Pemuliaan Kelapa Sawit. *Warta PPKS, Medan.* Vol. 6(1): 1-8.

- Asmono, D., P. Guritno, dan K. Pamin. 1999. Peluang, Tantangan, dan Arah Penelitian Pemuliaan Kelapa Sawit di Indonesia. *Warta PPKS, Medan*. Vol. 7 (1) : 1-9
- Asmono D, A R Purba, Y Yenni, M Kohar, H Zaelanie, T Liwang dan A B Beng. 2005. Peta dan prospek pemuliaan dan industri perbenihan kelapa sawit Indonesia. Simposium Nasional dan Kongres V Simposium Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia, Purwokerto, 25-27 Agustus 2005.
- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan Markah Molekuler dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman. *J. Agrobiogen*. Vol. 1 (1):26-37.
- Billote N N. Marseillac A M. Risterucci B. Adon P. Brotteir F C. Baurens R. Singh A. Herran H. Asmady and Billot C. 2005. Microsatellite-Based High Density Linkage Map in Oil Palm (*Elaeis guineensis* jacq.). *Theor Appl. Genet.* 98: 780-792.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Bredemeijer, G.M.M., P. Arens, D. Wouters, D. Visser, and B. Vosman. 1998. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 97:584-590.
- Corley, R.H.V. 2009. In: *The Oil Palm* 4th edn, pp. 1–26. Blackwell Science.
- Hairinsyah, (2010). Pendugaan parameter genetik dan analisa keragaman genetik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dengan marka Simple Sequence Repeat (SSR). IPB. Bogor. Available at <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/46891>.
- Julisaniah, N.I., L. Sulistyowati, dan A.N. Sugiharto. 2008. Analisis kekerabatan mentimun (*Cucumis sativus* L.) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim. *Biodiversitas*. 9 (2): 99-102.
- Liu, K.S.V., S.V. Muse. 2005. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2137.
- Narvel, J.M., W. Chu, W.R., Fehr, P.B., Cregan, and R.C. Shoemaker. 2000. Development of Multiplex Sets of Simple Sequence Repeat DNA Markers Covering The Soybean Genome. *Mol. Breed.* 6:175-183.
- Pootakham, W., N. Jomchai, P. Ruangareerate, J. R. Shearman, C. Sonthirod, D. Sangsrakru, S. Tragoonrung, and S. Tangphatsornruang. 2015. Genome-wide SNP discovery and identification of QTL associated with agronomic traits in oil palm using genotyping-by-sequencing (GBS). *Genomics* 105: 288–295.
- Powell, W., Machrax, G. C. & Provan, J. 1996. Polymorphism Reveald by Simple Sequence Repeats, *Trends in Plant Science*. 1:215-222.
- Restu M, Mukrimin dan Gusmiaty. 2012. Optimalisasi Teknik Ekstraksi dan Isolasi DNA Tanaman Suren (*Toona Sureni* Merr.) untuk Analisis Keragaman Genetik berdasarkan Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *J. Natur. Indonesia*.
- Rohlf FJ. 2003. *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate System* versi 2.1 User Guide. Department of Ecology and Evolution State University of New York. P.31.
- Sayekti, U., U. Widyastuti., dan N. T. Mathius. 2015. Keragaman Genetik Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Asal Angola Menggunakan Marka SSR. *Jurnal Agron Indonesia*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Setiyo, I. E., 2000. Pemetaan dan Keragaman Genetik RAPD pada Kelapa Sawit sungai pancur (RISPA). Tesis. Program Pasca sarjana IPB. Bogor.
- Singh R J. Nagappan S G. Tan J M. Panandam and Cheah S C. 2007. Development of Simple Sequence Repeat (SSR) markers for oil palm and their application in genetic mapping and finger

printing of tissue culture clones. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 15(3): 121- 131.

Singh, R., L. L. Eng-Ti, L. C. L. Ooi, M. Ong- Abdullah, N. C. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, M. D. Amiruddin, R. Rosli, M. A. A. Manaf, K. L. Chan, M. A. Halim, N. Azizi, N. Lakey, S. W. Smith, M. A. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A. V. Brunt, C. Wang, J. M. Ordway, R. Sambanthamurthi, and R. A. Martienssen. 2013b. The oil palm Shell gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500: 340–344. doi:10.1038/nature12356.

Tasma, I.M., dan S. Arumsari. 2013. Analisis diversitas genetik aksesori kelapa sawit Kamerun berdasarkan marka SSR. *J. Littri* 19:194-202.

[USDA] United States Department of Agriculture. 2014 July. Oilseeds: world markets and trade. Circular Series FOP 07-14.

Weeden N F, Timmerman G M, Hemmat M, Kneen B E and Lodhi M A. 1992. Mapping in Woody Plants with RAPD Markers: Application to Breeding in Forestry and Horticulture. *In*. Application of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, November 1, 1992, Minneapolis, MN. Crop Science Society of America, Madison, WI. pp. 41-43.

Wening, S dan Yenni Y. 2013. Optimasi analisis sidik jari DNA kelapa sawit. *Pertemuan teknis kelapa sawit*. Jakarta, 6-8 april 2013.

Williams, J. G. K. et al. (1990). "DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers". *Nucleic Acid Research*. 18, (22), 6531-6535.

Yusuf, Z. K. 2010. Polymerase chain reaction (PCR). *Saintek*, 5 (6).

Zulfahmi. 2013. Penanda DNA Untuk Analisis Genetik Tanaman. *Jurnal Agroekotknologi UIN, Riau*.

Zulhermana. 2009. Keragaman Genetik Intra dan Interpopulasi Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) Pisifera Asal Nigeria

Berdasarkan Analisis Marka *Simple Sequence Repeats* (SSR). Institut Pertanian Bogor, Bogor.