

Keragaman Genetik Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Populasi Nigeria Berdasarkan Analisis Marka SSR (*Simple Sequence Repeats*)

TINCHE¹, DWI ASMONO², DINY DINARTI¹, SUDARSONO¹

¹PMB LAB, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680 - Indonesia

² PT Sampoerna Agro, Jl. Basuki Rahmat No. 788 Palembang 36127
E-mail: tinche.tc@gmail.com

Diterima 16 Januari 2014 / Direvisi 2 April 2014 / Disetujui 23 Mei 2014

ABSTRAK

Sempitnya sumber genetik kelapa sawit yang tersedia di Indonesia menyebabkan keterbatasan dalam pengembangan program pemuliaan. Salah satu cara untuk memperluas sumber genetik adalah menggunakan populasi introduksi. Hasil eksplorasi dan pemuliaan populasi Nigeria menunjukkan beberapa keunggulan dalam karakter komersial kelapa sawit. Tujuan dari studi ini adalah untuk seleksi primer SSR yang polimorfik, mencari primer SSR yang memiliki alel spesifik untuk Pisifera dan mengevaluasi keragaman genetik intrapopulasi Nigeria DP-E. Seratus lima primer SSR digunakan untuk skrining primer dan 25 marka SSR terpilih untuk digunakan dalam tahap evaluasi keragaman genetik. Segregasi marka yang diperoleh dari hasil seleksi 105 marka SSR cukup tinggi (91,4% polimorfik). Primer mEgCIR0037 dan mEgCIR3382 merupakan primer yang paling informatif dari hasil seleksi. Marka dengan alel spesifik Pisifera dapat digunakan untuk tujuan eksplorasi marka yang berasosiasi dengan karakter warna buah. Pada hasil studi ini, 25 marka SSR mampu memperlihatkan keragaman genetik dan struktur populasi DP-E. Analisis jarak genetik dengan pengelompokan UPGMA menghasilkan dua kelompok besar dengan koefisien kemiripan 56% dan tiga subgrup progeni pada koefisien kemiripan 63%. Estimasi struktur populasi dengan program STRUCTURE menunjukkan adanya rekombinasi yang tinggi pada individu progeni. Jumlah individu rekombinasi yang tinggi menguntungkan dalam pemilihan individu untuk seleksi pada program pemuliaan selanjutnya.

Kata kunci : Kelapa sawit, keragaman genetik, populasi Nigeria, SSR, *virescens*, warna buah.

ABSTRACT

Genetic Diversity of Oil Palm Originated from Nigeria based on SSR (Simple Sequence Repeats) markers

The narrow genetic base of Indonesian oil palm collections limited the progress of breeding programs. A way to broaden the genetic source was to introduce other breeding populations. The exploration and breeding programs of Nigerian oil palms showed several commercial valued characters. The aims of this study were to screen polymorphic SSR primers, to identify SSR primers that amplified Pisifera's specific bands and to evaluate the genetic diversity of Nigerian population DP-E. 105 SSR markers were used in primer screening and 25 markers were selected for genotyping. The marker segregation obtained from 105 SSR markers in this study was relatively high (91.4% polymorphic). Primer mEgCIR0037 dan mEgCIR3382 were the most informative primers based on the selection. Markers with specific alleles for Pisifera could be used to find markers that associated with fruit color trait. In this study, 25 SSR markers could reveal the genetic diversity and population structure of DP-E population. Genetic analysis with UPGMA clustering system generated two clusters with 56% similarity coefficient and three sub-clusters of progenies DP-E with 63% similarity coefficient. Estimation of population structure using STRUCTURE software showed high recombination numbers in progenies. The high recombination numbers in progenies would be an advantage in providing genetic materials to be selected for further breeding programs.

Keywords: Fruit color, genetic diversity, Nigeria population, Oil palm, SSR, *virescence*.

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang penting dan strategis dalam mendukung peningkatan pendapatan petani dan penambahan devisa negara Indonesia. Tanaman ini merupakan tanaman penghasil minyak nabati utama dunia (39,9%) selain kedelai (26,6%),

kanola (14,9%), biji bunga matahari (8,8%) dan beberapa komoditi lainnya (USDA, 2014). Suplai terbesar minyak kelapa sawit berasal dari Indonesia (33,500 MT) diikuti oleh Malaysia (20,800 MT), Thailand (2,250 MT) dan negara lainnya (6,248 MT) berdasarkan data produksi minyak sawit dunia per Juli 2014. Di Indonesia, penambahan area penanaman kelapa sawit masih terus meningkat hingga 8% per

tahun (BPS, 2011). Pertambahan luasan tanam dan produksi kelapa sawit saat ini belum mencukupi untuk memenuhi konsumsi dunia berdasarkan prediksi permintaan konsumsi minyak sayur dan peningkatan populasi dunia (Corley, 2009). Beberapa alternatif untuk memenuhi permintaan tersebut adalah dengan memaksimalkan pengelolaan perkebunan yang ada dan penggunaan bibit dengan karakter yang unggul.

Sumber genetik kelapa sawit yang dikembangkan di Indonesia berasal dari empat kecambah yang ditanam di Kebun Raya Bogor pada tahun 1848. Pohon yang tumbuh dari kecambah ini relatif seragam dengan tipe Dura dan diindikasikan berasal dari satu induk. Program pemuliaan kelapa sawit Indonesia dikembangkan dari populasi ini dan dikenal sebagai 'kelapa sawit Deli'. Dura Deli memiliki beberapa keunggulan: buahnya besar dan mesokarp yang mengandung minyak tinggi (60%) (Hartley, 1988). Implikasi dari pengembangan Dura Deli ini menyebabkan keragaman genetik kelapa sawit Indonesia menjadi relatif sempit.

Salah satu upaya untuk memperluas keragaman genetik ini adalah dengan mengintroduksi sumber genetik baru. Populasi kelapa sawit asal Nigeria adalah salah satu sumber genetik yang digunakan. Beberapa keunggulan dari populasi Nigeria: memiliki pertumbuhan tinggi yang lambat (15-25 cm per tahun), kadar iodine tinggi (IV > 70) dan rata-rata kernel per tandan yang tinggi di atas 12% (Rajanaidu dan Rao, 2002).

Metode pemuliaan kelapa sawit dominan menggunakan *Reciprocal Recurrent Selection* (RRS) dengan salah satu poin pentingnya adalah penggunaan dua populasi dasar: populasi 'A' terdiri dari Dura Deli dari beberapa *origin* dan populasi 'B' terdiri dari tenera dan Pisifera *origin* Afrika (Corley and Tinker, 2003). Skema persilangan interpopulasi pada RRS memungkinkan eksploitasi heterosis untuk meningkatkan performa persilangan antar dua populasi (Acquaah, 2007; Price *et al.*, 2007).

Pada buah kelapa sawit, tipe buah muda yang paling sering ditemui berwarna ungu gelap hingga hitam pada bagian apex dan kuning kehijauan pada bagian basal buah sebelum buah masak, disebut dengan *Nigrescens*. Tipe lain yang kurang lazim ditemui berwarna hijau sebelum masak dan disebut *Virescens*. Tipe ini berubah warna menjadi jingga kemerahan pada saat masak, meskipun bagian apex dari eksternal buah tetap hijau (Corley dan Tinker, 2003). Warna buah *Virescens* ini juga ditemui pada beberapa aksesori di populasi Nigeria. Karakter *Virescens* merupakan karakter penting yang dapat digunakan untuk menentukan waktu panen yang tepat sehingga meminimalkan kehilangan hasil pada saat panen. Analisis genetik karakter *Virescens* belum

banyak dilakukan terutama pada populasi spesifik yaitu populasi yang berasal dari Nigeria.

Studi ini menggunakan marka SSR (*Simple Sequence Repeats*), yang berdasarkan pada sejumlah sekuen DNA berulang (2-5 nukleotida) yang terdapat dalam mikrosatelit. Dalam beberapa tahun terakhir, SSR menjadi salah satu marka molekuler yang banyak diaplikasikan pada berbagai komoditi seperti beras (Siwach *et al.*, 2004), jagung (Vigouroux *et al.*, 2005) dan komoditi lainnya. SSR memiliki keunggulan karena bersifat kodominan, sangat polimorfik, banyak dan tersebar diseluruh genom, hampir selalu berupa lokus tunggal, tidak ambigu, secara spesifik terpetakan di genom, dan berdasarkan pada teknologi berbasis PCR (Chen *et al.*, 2007).

Pada kelapa sawit, marka SSR pertama kali diaplikasikan oleh Billotte *et al.* (2001) dan kemudian digunakan untuk konstruksi peta genetik (Billotte *et al.*, 2005; Billotte *et al.*, 2010), analisis keragaman genetik (Ting *et al.*, 2010), analisis parental (Thongthawee *et al.*, 2010), dan verifikasi hibrida (Thawaro dan Te-chato, 2009). Tujuan dari studi ini adalah untuk seleksi primer SSR yang polimorfik, mencari primer SSR yang memiliki alel spesifik untuk Pisifera, dan mengevaluasi keragaman genetik intrapopulasi Nigeria. Informasi yang diperoleh dari penelitian ini selanjutnya akan digunakan untuk mencari marka SSR yang berasosiasi dengan karakter warna buah *Virescens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di *Integrated Laboratory* PT. Sampoerna Agro, Palembang, Sumatera Selatan dan *Plant Molecular Biology*, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Pemilihan Populasi

Tanaman yang digunakan dalam survei berjumlah 2.480 pohon, terdiri dari 53 famili hasil persilangan enam genotipe Pisifera dengan 51 genotipe Dura berdasarkan desain alpha (*alpha design*). Survei warna buah dikategorikan menjadi dua: *virescens* (*vir*) dan *nigrescens* (*nig*). Populasi yang dipilih adalah 107 pohon kelapa sawit yang terdiri atas 10 pohon pisifera, 50 pohon dura dan 47 pohon progeni hasil persilangan D x P terpilih asal Nigeria. Observasi karakter warna buah dilakukan pada populasi terpilih untuk memperoleh informasi fenotipe.

Ekstraksi DNA dan prosedur SSR

Sampel daun tombak digunakan untuk ekstraksi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), yang diisolasi menggunakan metode *Cetyl-trimethylammonium bromide* (CTAB) berdasarkan modifikasi dari Orozco-Castillo *et al.* (1994). Pengecekan kualitas dan kuantitas DNA menggunakan 0,8% gel agarose dan diwarnai dengan GelRed™. Gel divisualisasi dengan Bio Rad Gel Doc™ UV-Transluminator. Campuran *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terdiri dari 9,5 µl ddH₂O, 12,5 µl Promega GoTaq®Green master mix (*Taq* DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂ dan buffer reaksi), 1,0 µl primer *forward*, 1,0 µl primer *reverse* dan 5 ng/µl DNA *template*. *Polymerase Chain Reaction* dijalankan dengan tahap denaturasi pertama pada suhu 95°C selama 1 menit. Tahap denaturasi kedua pada suhu 94 °C selama 30 detik. Tahap *annealing* sesuai dengan *T_a* primer selama 1 menit, tahap *extension* pada suhu 72°C selama 2 menit dan tahap *final extension* pada suhu 72 °C selama 8 menit. Proses dijalankan dengan 35 siklus sebelum suhu diturunkan ke 4°C. Produk PCR dipisahkan menggunakan Cole-Parmer® *Dedicated Height Sequencer* pada gel akrilamid 6% dengan buffer SB 1X (Brody dan Kern, 2004) dan diwarnai dengan perak nitrat (Creste *et al.*, 2001) untuk visualisasi.

Seleksi Primer dan Genotyping

Primer-primer yang dipilih sebanyak 105 (Billotte *et al.*, 2005) digunakan dalam proses skrining primer. Materi genetik yang digunakan dalam skoring primer adalah 10 sampel Pisifera dan lima DNA *bulk* dari masing-masing lima genotipe Dura. *Deoxyribonucleic Acid bulk* per genotipe Dura diperoleh dengan cara mem-*bulk* DNA dari 10 individu Dura dalam genotipe yang sama. Pada tahap *genotyping*, populasi yang digunakan adalah DP-E dengan 47 sampel progeni, tetua jantan (P3) dan tetua betinanya (D3). Primer yang digunakan pada tahap ini adalah 25 primer SSR.

Analisis Data

Pita-pita yang diperoleh pada plat kaca diskoring manual sebagai data biner dengan kode 1 jika ada pita, dan kode 0 jika tidak ada pita. Data hasil skoring digunakan untuk estimasi parameter keragaman genetik dalam populasi: *Polymorphic Information Content* (PIC) menggunakan persamaan matematika:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n P_i^2 P_j^2.$$

Software CERVUS 2.0 (Marshall *et al.*, 1998) digunakan untuk estimasi heterozigositas (He) berdasarkan Nei

(1972), $He = 1 - \sum P_i^2$, dengan P_i adalah rata-rata frekuensi ke-*i* alel SSR. Software POPGENE (Yeh *et al.*, 1999) digunakan untuk kalkulasi alel efektif (N_e). Analisis pengelompokan berdasarkan *Unweighted pair-group with arithmetic average* (UPGMA) dengan koefisien Dice (1945) menggunakan software NTSYSpc ver. 2.20 (Rohlf, 2009).

Program STRUCTURE V2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) digunakan untuk mengestimasi struktur populasi yang menunjukkan kemiripan genotipe dalam sub group. Setiap individu dijalankan pada kisaran kluster genetik K=1 hingga K=10 dengan model *admixture*, dan setiap K diulang sebanyak 20 kali. Setiap *run* diimplementasikan dengan *burn-in period* 100,000 *steps* diikuti dengan replikasi 250,000 *Monte Carlo Markov Chain*. Plot hasil didasarkan pada konsensus permutasi *Q-matrix* dari 20 replikasi setiap K menggunakan program CLUMPP (Jakobsson dan Rosenberg, 2007) dan ditampilkan dengan bantuan program DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Populasi

Populasi Pisifera Nigeria kelapa sawit yang digunakan dalam studi merupakan material introduksi dari ASD Costa Rica oleh PT. Bina Sawit Makmur (anak perusahaan PT. Sampoerna Agro) antara tahun 1995 hingga 1998. Total pohon yang diobservasi dalam penelitian ini adalah 2.480 pohon, terdiri dari 53 famili hasil persilangan enam genotipe Pisifera dengan 51 genotipe Dura berdasarkan desain *alpha* (*alpha design*). Observasi warna buah dikategorikan menjadi dua: *vir* dan *nig*. Berdasarkan hasil observasi, 19 famili memiliki segregasi warna buah *vir* dan *nig*; 34 famili lainnya memiliki warna buah yang seluruhnya *nig* (hitam).

Sembilan belas famili yang memiliki segregasi warna buah diuji rasio segregasi turunannya untuk karakter tersebut. Lima populasi dura (D1, D2, D3, D4, D5) dan satu populasi DP-E terpilih untuk digunakan dalam seleksi primer dan *genotyping* (Tabel 1). Genotipe-genotipe ini terpilih karena segregasi warna buah *vir* dan *nig* nya mendekati rasio 1:1 dengan uji khi kuadrat.

Polimorfisme Mikrosatelit pada Seleksi Primer

Hasil seleksi 105 primer spesifik SSR menunjukkan lima primer (4,8%) tidak menghasilkan pita, empat primer (3,8%) menghasilkan pita monomorfik dan 96 primer (91,4%) menghasilkan pita polimorfik. Enam primer (mEgCIR3828, mEgCIR0803, mEgCIR2423, mEgCIR0588, mEgCIR3747 dan mEgCIR2813) hanya menghasilkan pita pada sampel

Tabel 1. Genotipe terpilih berdasarkan hasil observasi dan analisis segregasi karakter warna buah untuk seleksi primer.
 Table 1. List of selected genotypes based on the observation and analysis of fruit color segregation ratio for primer selection.

Genotype Genotype	Tipe Buah Fruit Type	Jumlah Contoh No. of samples
DP-E	Tenera	47
D1	Dura	10
D2	Dura	10
D3	Dura	10
D4	Dura	10
D5	Dura	10
P	Pisifera	10

Dura tetapi tidak pada individu Pisifera. Primer tersebut dapat dikategorikan sebagai primer spesifik Dura (Gambar 1). Dua puluh lima primer (Tabel 2) yang menghasilkan alel spesifik Pisifera (Gambar 2) diperoleh dari seleksi lanjut 96 primer yang polimorfik. Primer ini digunakan selanjutnya dalam tahap *genotyping*.

Sampel Dura (D1-D5) merupakan sampel *bulk* atau gabungan DNA dari 10 sampel setiap genotipe. Hasil amplifikasi pita pada kelima sampel adalah 0 (tidak ada amplikon) dan maksimal dua pita. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi pollen lain pada saat persilangan D x D dan tidak ada *mislabeling* pada saat perkecambahan benih dan transportasi hingga penanaman di lapangan untuk sampel yang digunakan.

Persentase lokus polimorfik pada tahap seleksi primer adalah 96%. Angka ini menunjukkan heterozigositas yang tinggi antara individu Pisifera dan populasi Dura. Nilai PIC rata-rata dan nilai He (heterozigositas yang diharapkan) rata-rata pada populasi seleksi primer adalah 0,45 dan 0,51. Nilai ini mengindikasikan bahwa populasi yang digunakan memiliki keragaman genetik moderat (Hildebrand *et al.*, 1992) pada set primer yang digunakan dalam seleksi. Total alel yang diperoleh adalah 327 alel dengan variasi antara satu hingga tujuh alel per lokus. Lokus mEgCIR0037 (6 alel) dan mEgCIR3382 (7 alel) menghasilkan jumlah alel tertinggi.

Analisis Keragaman Genetik pada populasi DP-E

Pada tahap *genotyping*, populasi yang digunakan adalah DP-E hasil persilangan tetua D3 dan tetua P3. Informasi genetik pada populasi DP-E

disajikan dalam Tabel 3. Tingkat polimorfisme DP-E dievaluasi dengan mengkalkulasi nilai PIC pada 25 loci SSR. Nilai PIC maksimum diperoleh pada angka 0.701 pada primer mEgCIR3310 yang menunjukkan lokus ini paling informatif. Primer mEgCIR0146 dan mEgCIR2860 adalah loci yang paling kurang informatif (PIC = 0,272). Nilai Ho (heterozigositas yang diamati) berkisar antara 0.41 hingga 1 (rata-rata Ho = 0,75), dan kisaran nilai He adalah 0,33 - 0,75 (rata-rata He = 0.54). Nilai rata-rata He dan Ho mengindikasikan keragaman genetik yang relatif tinggi intrapopulasi DP-E. Total alel yang dihasilkan dari 25 primer SSR adalah 69 alel dengan kisaran alel efektif 1,48-3,97 dan rerata alel efektif (Ne) 2,44.

Hasil penelitian memperlihatkan penurunan nilai rata-rata He 0.54 dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Putri *et al.* (2010) (0,663) pada tiga populasi Nigeria dari koleksi yang sama dengan penelitian ini, dan Bakoume *et al.* (2009) (0,644) pada lima populasi alami asal Nigeria. Rerata jumlah alel (Na) hasil penelitian ini (2,76) lebih tinggi daripada nilai yang diperoleh Abdullah *et al.* (2011) pada populasi elit Deli - AVROS = 2,3 tetapi lebih rendah dari hasil penelitian Zulhermana *et al.* (2010) pada populasi Nigeria = 3,3, Putri *et al.* (2010) pada populasi Nigeria = 4,5, Ajambang *et al.* (2012) pada populasi alami asal Kamerun = 4,71 dan Billotte *et al.* (2001) pada populasi La Me x Dura Deli = 5,25.

Rendahnya jumlah alel yang ditemukan dapat dijelaskan oleh jenis populasi yang digunakan dalam penelitian. Populasi yang digunakan adalah populasi elite hasil pemuliaan dan persilangan dari beberapa individu yang mempengaruhi variabel jumlah alel dan populasi (Arias *et al.*, 2012). *Rare* alel tidak



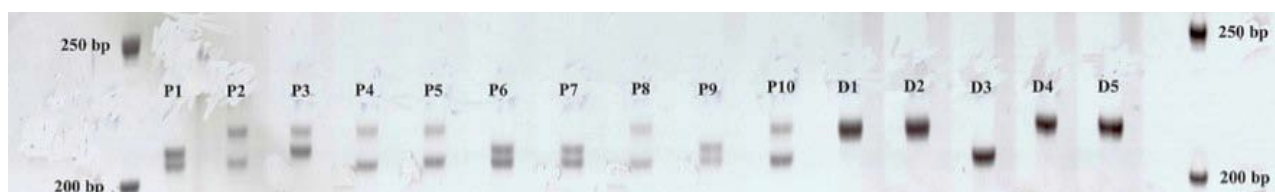
Gambar 1. Profil marka SSR pada genotipe Pisifera (P) dan Dura *bulk* (D1-D5) menggunakan primer mEgCIR0588. Pada sampel Pisifera tidak ada pita yang teramplifikasi.

Figure 1. The SSR marker profile of Pisiferas (P) and bulked Duras (D1-D50) using mEgCIR0588 marker. There was no amplified product on Pisiferas' samples.

ditemukan pada hasil penelitian. Hal ini disebabkan kecenderungan umum kehilangan keragaman genetik yang disebabkan perbaikan genetik pada kelapa sawit (Arias *et al.*, 2012; Bakoume *et al.*, 2007).

Analisis pengelompokan UPGMA menggunakan 25 primer SSR pada populasi DP-E (Gambar 3) menghasilkan dua kelompok besar, yaitu kelompok pertama ditandai dengan huruf P1 (tetua jantan) dan kelompok dua yang terdiri atas P2 (tetua betina) dan F1 (progeni DP-E). Kelompok progeni dapat dibagi menjadi subgrup I dan II (A dan B). Kelompok progeni DP-E terbagi menjadi tiga subgrup pada tingkat kemiripan 63%. Subgrup I terdiri atas 11 progeni dengan warna buah *Vir* dan tiga progeni

dengan warna buah *nig*. Subgrup II.A terdiri dari lima progeni *Vir* dan lima progeni *nig*, sedangkan subgrup II.B terdiri atas tujuh progeni *Vir* dan 16 progeni *nig*. Nilai kemiripan genetik berkisar dari 0,56 (antara kelompok satu dan dua) hingga 1.00 (antara E23 dan E24, E27 dan E28). Dendrogram memperlihatkan individu progeni dengan warna buah *Vir* tidak mengelompok secara spesifik pada salah satu subgrup. Penggunaan marka SSR dalam studi ini mampu menunjukkan keragaman genetik progeni dalam populasi DP-E dan sejalan dengan hasil penelitian Allou *et al.* (2008) pada populasi kelapa sawit BRT10 dan Ilhase *et al.* (2014) pada populasi NIFOR.



Gambar 2. Profil marka SSR pada genotipe Pisifera (P1-P10) dan Dura bulk (D1-D5) menggunakan primer *mEgCIR3376*. Tanda panah pada gambar menunjukkan alel spesifik pada Pisifera.

Figure 2. The SSR marker profile of Pisiferas (P1-P10) and bulked Duras (D1-D5) using *mEgCIR3376* marker. The arrow showed the specific allele found in Pisiferas only.

Tabel 2. Primer hasil seleksi pada populasi Dura dan Pisifera yang terpilih untuk *genotyping*.

Table 2. List of primers selected based on primer screening in Duras and Pisiferas population.

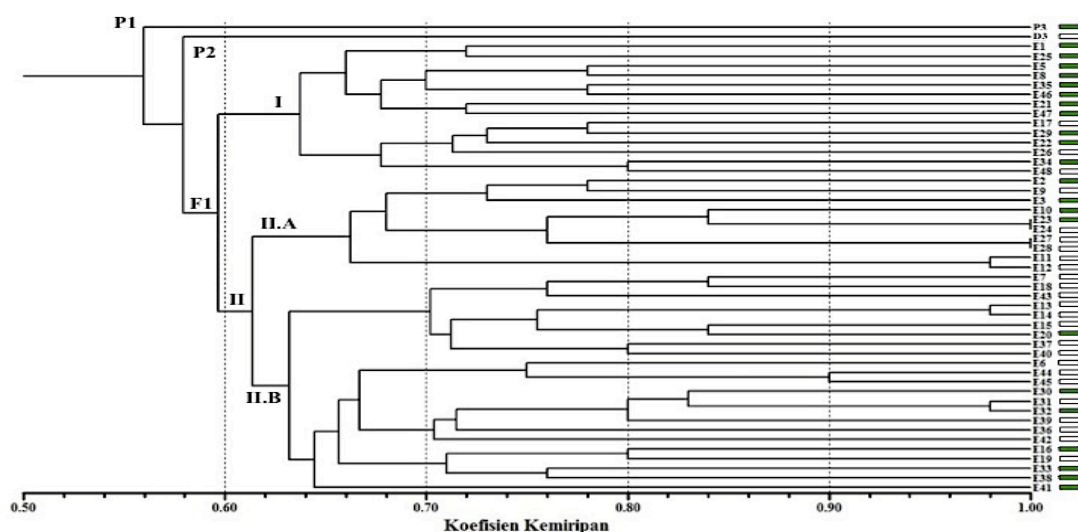
Primer Primers	Motif Repetisi Repeat Motif	Sekuen-5' 5'-Sequence	Sekuen-3' 3'-Sequence	Ta	LG ^a
mEgCIR378	(GA)18	TTGTATGACCAAAGACAGC	AGCGCAACATCAGACTA	52	1
mEgCIR381	(GA)17	CCTCCTTTGGAATTATG	GTGTTTGATGGGACATACA	52	1
mEgCIR329	(GA)13	GGCGGGGCCGAAGGTAGAGG	TCCGGCCCTAGCACCACAT	52	1
mEgCIR381	(GA)19	CATACCCTGCTTATCTTTC	GATAGATACCCGTTAGTTGAC	52	1
mEgCIR080	(GA)18	GTGGGACAATTGAAAGGGAAG	CCAGCTGCCAAATGCTGTAG	56	2
mEgCIR040	(CCG)5	TTGCGGCCCATCGTAATC	TCCCTGCAGTGTCCCTCTTT	58	2
mEgCIR368	(GA)15	GTAGCTTGAACCTGAAA	AGAACCACCGGAGTTAC	52	2
mEgCIR234	(GA)15	ATTTTGCATGTGTTGAGAGC	CAACCAATTGCACCCTAAAG	52	3
mEgCIR371	(GA)19	GCAGACATGGCAGCAAAAAG	GGGGATGTTCTTGATATCA	52	4
mEgCIR191	(GA)12	CGATCTTCTAGCGTGCAAGA	ATTCCCCACCTCCTCCACAC	52	4
mEgCIR331	(GA)18	ATCATGGCCGATCTGTATTA	GGAATGCTGGTCATGGAATA	52	4
mEgCIR390	(GA)17	ACAATAACCTGAGACAACAAG	ATACATCCCCTCCCCTCTCT	52	5
mEgCIR328	(GA)17	TTTCTTATGGCAATCACACG	GGAGGGCAGGAACAAAAG	52	6
mEgCIR089	(GA)18	TGCTTCTTGCTTTGATACA	CCACGTCTACGAAATGATAA	52	7
mEgCIR337	(GA)19	CCCTCCCTGTCTACCTTCT	TTATGTGAGTGCCTTTGATG	52	8
mEgCIR387	(GA)25	TAGTTTTCCCATCACAGAGT	ACAATATTTAGACCTTCCAT	52	9
mEgCIR082	(GA)21	AGTGAGGTATGGTTGATTAGG	TATTGATAGCATTTGGGATT	52	10
mEgCIR078	(GA)13	ACATTCCCTCTATTATTCTCAC	GTTTTGTTTGGTATGCTTGT	52	10
mEgCIR014	(GT)2(GA)27	GACCTTTGTGTCAGCATACTTGGT	GCAGGCCTGAAATCCCAAAT	58	10
mEgCIR338	(GA)24	TGTAGGTGGTGGTTAGG	TGTCAGACCCACCATTAA	52	11
mEgCIR077	(GT)7(GA)8	GCAAAATTCAAAGAAACTTA	CTGACAGTGCAGAAAATGTT	52	15
mEgCIR286	(GA)12	AGGGAGGCGAACGAGAAACA	CGACTGCTGATGGGGAAGA	52	15
mEgCIR003	(GA)17	CCAGTCTGCTAACCATCCTATA	TCTCACTTCCCTCCACATC	52	15
mEgCIR243	(GT)7ca(GA)8	AACACTCCAGAAGCCAGGTC	GGTTTAGGTATTGGAAGTGA	52	16
mEgCIR375	(GA)16	GATGTTGCCGCTGTTTG	CATCCCATTTCCTCTT	52	16

Keterangan/Note : Ta. = Annealing Temperature, LG = Linkage Group, ^aPrimer yang digunakan dikembangkan oleh Billotte *et al.* (2005). Primers used in the study was developed by Billotte *et al.* (2005).

Tabel 3. Data heterozigositas, jumlah alel dan *Polymorphic Information Content* (PIC) pada populasi DP-E dengan 25 marka SSR.Table 3. *Heterozygosity, number of alleles and Polymorphic Information Content (PIC) of DP-E population based on 25 SSR markers.*

Primer Primer	Ho	He	Jumlah alel No. of Alleles	PIC
mEgCIR3310	1.00	0.76	4	0.701
mEgCIR0773	0.98	0.63	3	0.551
mEgCIR1917	1.00	0.75	4	0.698
mEgCIR0146	0.41	0.33	2	0.272
mEgCIR2347	0.67	0.57	3	0.502
mEgCIR3376	0.98	0.63	3	0.554
mEgCIR3902	0.63	0.44	2	0.339
mEgCIR2436	0.51	0.38	2	0.308
mEgCIR3819	0.84	0.64	3	0.561
mEgCIR0825	0.67	0.55	3	0.483
mEgCIR3878	0.98	0.63	3	0.546
mEgCIR0037	0.82	0.66	3	0.584
mEgCIR3281	0.53	0.39	2	0.314
mEgCIR3788	0.82	0.65	3	0.570
mEgCIR3297	1.00	0.66	3	0.582
mEgCIR3813	0.45	0.35	2	0.288
mEgCIR3683	0.45	0.35	2	0.288
mEgCIR0800	0.47	0.36	2	0.295
mEgCIR0788	1.00	0.74	4	0.688
mEgCIR0894	1.00	0.75	4	0.695
mEgCIR3716	0.61	0.43	2	0.335
mEgCIR3382	0.98	0.63	3	0.549
mEgCIR2860	0.41	0.33	2	0.272
mEgCIR0408	0.98	0.66	3	0.581
mEgCIR3750	0.53	0.39	2	0.314

Keterangan/Note: Ho = heterozigositas yang diamati/*observed heterozygosity*; He = heterozigositas yang diharapkan/*expected heterozygosity*.



Gambar 3. Dendrogram analisis UPGMA populasi DP-E menggunakan 25 primer SSR. P1 = tetua jantan P3, P2 = tetua betina D3, F1 = turunan hasil persilangan P1 dan P2 (DP-E). Tanda kotak di kanan label individu menunjukkan fenotipe warna buah; kotak berwarna hijau = *Virescens* dan kotak berwarna putih = *nigrescens*.

Figure 3. Dendrogram UPGMA analysis of DP-E population using 25 SSR primers. P1 = male parent (P3), P2 = female parent (D3), F1 = progenies resulting from the cross between P1 and P2 (DP-E). The boxes on the right side of each individual showed the fruit color phenotype; green box = *Virescence* and white box = *nigrescence*.

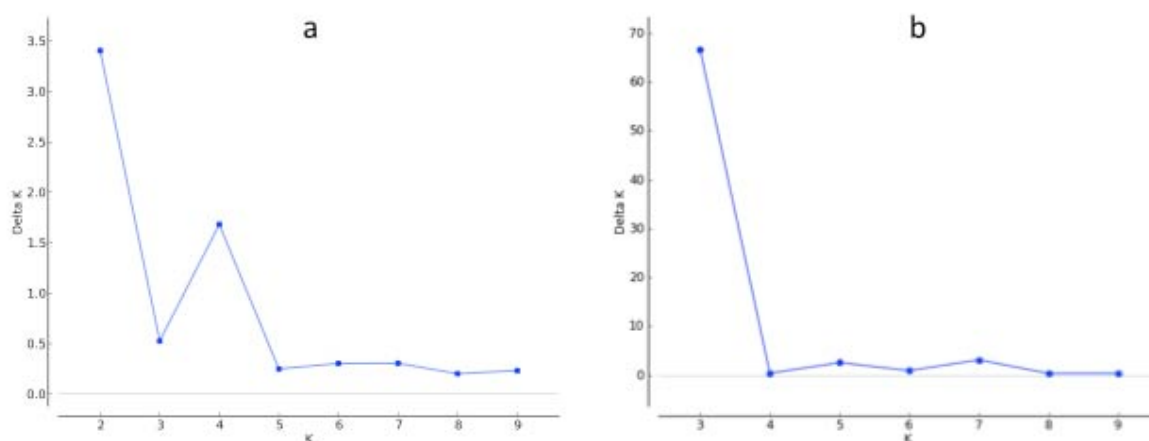
Struktur populasi DP-E ditunjukkan oleh Gambar 4. Jumlah subgrup populasi, K, dievaluasi menggunakan metode yang dikemukakan oleh Evanno *et al.* (2005). *Log likelihood* hasil analisis STRUCTURE V2.3.4 meningkat secara bertahap dari K= 1 hingga K=10 dan tidak menunjukkan titik optimum yang jelas (data tidak diperlihatkan). Sebaliknya, perhitungan *ad hoc* maksimum ΔK diperoleh pada K=2, yang mengindikasikan bahwa populasi DP-E dapat dibagi menjadi dua subgrup (Gambar 4a). Analisis STRUCTURE V2.3.4 secara terpisah juga dilakukan untuk menduga struktur populasinya progeni DP-E. ΔK menunjukkan nilai maksimum pada K=3, yang mengindikasikan bahwa ada tiga subgrup di progeni DP-E (Gambar 4b).

Hasil analisis pengelompokan UPGMA dan STRUCTURE V2.3.4 sama-sama mengelompokkan populasi DP-E menjadi dua kelompok dengan tiga subgrup, dengan komposisi grup dan subgrup yang berbeda-beda. Metode analisis seperti UPGMA hanya dapat digunakan untuk menghubungkan prosedur statistik yang memungkinkan untuk identifikasi kluster homogen antar individu (Montilla-Bascon *et al.*, 2013). Program STRUCTURE V2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) sendiri menggunakan pendekatan Bayesian untuk menentukan K (jumlah subpopulasi dalam suatu koleksi) dan mengestimasi proporsi genom setiap aksesori yang berasal dari setiap sub populasi, atau disebut juga persentase campuran. Hal

ini yang menyebabkan perbedaan komposisi grup hasil analisis UPGMA dan STRUCTURE.

Kemiripan genetik tetua jantan (P3) dan tetua betina (D3) yang mencapai 56% pada analisis UPGMA menunjukkan komposisi genetik kedua individu ini tidak berbeda jauh. Analisis STRUCTURE juga memperlihatkan hasil yang serupa (Gambar 5a). Meskipun demikian, hasil persilangan dua tetua dengan *origin* yang berbeda menghasilkan variasi rekombinan yang tinggi pada progeninya. Estimasi struktur populasi progeni (Gambar 5a) memperlihatkan tidak ada individu progeni yang 100% mendekati kedua tetua. Pada K=3 di populasi progeni (Gambar 5b), hanya individu E2 dan E16 yang mendekati pola tetuanya, sedangkan 45 progeni lainnya merupakan rekombinan.

Persentase rekombinan yang tinggi dari hasil persilangan tetua Pisifera P3 dan Dura D3 pada populasi DP-E memberikan peluang yang besar untuk eksploitasi vigor hibrida. Individu rekombinan dengan fenotipe yang unggul seperti karakter pendukung hasil, ketahanan penyakit, penambahan tinggi yang lambat dapat digunakan untuk seleksi pada siklus pemuliaan berikutnya.

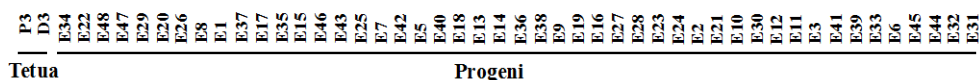


Gambar 4. Perubahan delta K (ΔK) sesuai dengan perbedaan K antara (a) populasi DP-E dan (b) 47 individu progeni DP-E yang diidentifikasi oleh STRUCTURE dengan model campuran.

Figure 4. Delta K changed according to different K between (a) population DP-E and (b) 47 progenies DP-E identified by STRUCTURE under admixture model.

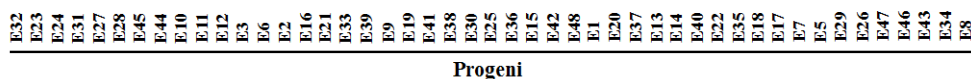
a.

K = 2



b.

K = 3



Gambar 5. Estimasi struktur populasi E berdasarkan data *genotyping* 25 lokus SSR pada populasi kelapa sawit DP-E (a) dan progeni DP-E (b) menggunakan program STRUCTURE. Setiap individu direpresentasikan dengan garis vertikal tipis. Jumlah subgrup (K) ditandai dengan perbedaan. Tinggi setiap bar merepresentasikan probabilitas penggolongan setiap individu dalam subgrup.

Figure 5. Estimation of population structure based on *genotyping* of 25 SSR loci on oil palm population DP-E (a) and DP-E progeny (b) using STRUCTURE software. Each individual is represented by a single vertical line, which can be partitioned into color segments. The height of each bar represents the probability of varieties belonging to different subgroups (represented by K).

KESIMPULAN

1. Segregasi marka yang diperoleh dari hasil seleksi 105 marka SSR cukup tinggi. Primer mEgCIR0037 dan mEgCIR3382 merupakan primer yang paling informatif dari hasil seleksi. Marka dengan alel spesifik Pisifera dapat digunakan untuk tujuan eksplorasi marka yang berasosiasi dengan karakter warna buah.
2. Dua puluh lima marka SSR mampu memperlihatkan keragaman genetik dan struktur populasi DP-E. Analisis jarak genetik dengan pengelompokan UPGMA menghasilkan dua kelompok besar dengan koefisien kemiripan 56% dan tiga subgrup progeni pada koefisien kemiripan 63%.
3. Estimasi struktur populasi dengan program STRUCTURE V2.3.4 menunjukkan adanya rekombinasi yang tinggi pada individu progeni. Jumlah individu rekombinasi yang tinggi menguntungkan dalam pemilihan individu untuk seleksi pada program pemuliaan selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada PT. Sampoerna Agro selaku sponsor dana dan penyedia

fasilitas penelitian, tim *Integrated Laboratory* PT. Sampoerna Agro (Zulhermana, Yulismawati, Mario R. Sirait, Upit Sarimana, Yulia Puspitaningrum) dan *Plant Molecular Biology Laboratory*-AGH, IPB atas dukungannya dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, N., M.R. Yusop, M. Ithnin, G. Saleh, M.A. Latif. 2011. Genetic variability of oil palm parental genotypes and performance of its progenies as revealed by molecular markers and quantitative traits. *C R Biologies*. 334:290-299.
- Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Oxford (UK): Blackwell.
- Ajambang, W. 2012. Microsatellite markers reveal Cameroon's wild oil palm population as a possible solution to broaden the genetic base in the Indonesian-Malaysia oil palm breeding programs. *African J Biotech*. 11(69):13244-13249.
- Allou, D., B. Adon, A. Sangare. Molecular variability from two selection of BRT10 population in an inbreeding program of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Côte d'Ivoire. *African J Biotech*. 7(20): 3550-3553.

- Arias D., C. Montoya, L. Rey, H. Romero. 2012. Genetic similarity among commercial oil palm materials based on microsatellite markers. *Agronomia Colombiana* 30(2): 188-195.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2011. Luas tanaman perkebunan besar menurut jenis tanaman, Indonesia. http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?kat=3&tabel=1&daftar=1&id_subyek=54¬ab=1 [diunduh 22 Juni 2012].
- Bakoume, C., R. Wickneswari, N. Rajanaidu, A. Kushairi, P. Amblard, N. Billotte. 2007. Allelic diversity of natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) populations detected by microsatellite markers: implications for conservation. *Plant Genetic Resource: Characterization and Utilization* 5(2): 104-107.
- Bakoume, C., R. Wickneswari, N. Rajanaidu, A. Kushairi, N. Billotte. 2009. Screening natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) populations using SSR markers. The International Society for Oil Palm Breeders (ISOPB) Seminar; 2010 November 4-5. Kuala Lumpur, Malaysia. [http://www.isopb.org/docs/2009/P6%20Bakoume%20Paper_Screening%20natural%20oil%20palm%20\(Elaeis%20guineensis%20Jacq\)%20populations%20using%20SSR%20marker.pdf](http://www.isopb.org/docs/2009/P6%20Bakoume%20Paper_Screening%20natural%20oil%20palm%20(Elaeis%20guineensis%20Jacq)%20populations%20using%20SSR%20marker.pdf)
- Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard, F.C. Baurens. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* 44:413-425.
- Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herran, H. Asmady, C. Billotte. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet*. 110:754-765.
- Billotte, N., M.F. Jourjon, N. Marseillac, A. Berger, A. Flori, H. Asmady, B. Adon, R. Singh, B. Nouy, F. Potier. 2010. QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor Appl Genet*. 120(8):1673-1687. doi:10.1007/s00122-010-1284-y.
- Brody, J.R., S.E. Kern. 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*. 36:214-216.
- Chen, C., Q. Yu, S. Hou, Y. Li, M. Eustice, R.L. Skelton, O. Veatch, R.E. Herdes, L. Diebold, J. Saw. 2007. Construction of a sequence-tagged high density genetic map of papaya for comparative structural and evolutionary genomics in brassicales. *Genetics*. 177:2481-2491. doi:10.1534/genetics.107.081463.
- Corley, R.H.V. 2009. How much palm oil do we need? *Environ Sci. and Policy*. 12:134-139.
- Corley, R.H.V., P.B. Tinker. 2003. The oil palm. 4th edition. Oxford (UK): Blackwell Science.
- Creste, S., A.T. Neto, A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeats polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19:299-306.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecology association between species. *Ecology*. 26(3): 297-302.
- Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Hartley, C.W.S. 1988. The oil palm. 3rd edition. London (UK): Longman.
- Hildebrand, C.E., D.C. Torney, R.P. Wagner. 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Sci*. 20:100-102.
- Ihase, R.O., R. Horn, G.O. Anoliefo, C.R. Eke, C.O. Okwuagwu, O. Asemota. 2014. Assessment of an oil palm population from Nigeria Institute for Oil Palm Research (NIFOR) for Simple Sequence Repeats (SSR) marker application. *African J Biotech*. 13(14): 1529-1540.
- Jakobsson, M., N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.
- Marshall, T.C., J. Slate, L.E.B. Kruuk, J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecology*. 7: 639-655.
- Montilla-Bascon, G., J. Sanchez-Martin, N. Rispail, D. Rubiales, L. Mur, T. Langdon, I. Griffiths, C. Howarth, E. Prats. 2013. Genetic diversity and population structure among oat cultivars and landraces. *Plant Mol Biol Rep* 31: 1305-1314.
- Orozco-Castillo, C, K.J. Chalmers, R. Waugh, W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet*. 87:934-940.
- Price, Z., S. Mayes, N. Billotte, F. Hafeez, F. Dumortier, D. MacDonald. 2007. Oil Palm. In Kole C. (Ed.). Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume 6. Berlin (DE): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 - 959.
- Putri, L.A.P., R. Rivallan, Zulhermana, Y. Puspitaningrum, Sudarsono, X. Perrier, D. Asmono, N. Billotte. 2010. Allelic diversity of 22 Sampoerna Agro's oil palm Pisifera based on microsatellite markers. (Ed. Siahaan D., Samosir Y., Herawan T., Rahutomo S., Jatmika A.,

- Erwinsyah., Susanto A., Sutarta E.S., Panjaitan F.R., Hasibuan H.A., Idris A.S., Melling L., Schuchardt F., Chanprasert, Ajambang W., Jacquemard J.C.) *International Oil Palm Conference 2010*; 2010 Juni 1-3; Yogyakarta, Indonesia. Medan: IOPRI. Hlm 397-404.
- Rajanaidu, N., R.V. Rao. 2002. Managing plant genetic resources and the role of private and public sectors: oil palm as a model. In Engels J.M.M., Rao R.V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (Eds.). *Managing Plant Genetic Diversity*. Wallingford (UK): CABI Publishing.
- Rohlf, F.J. 2009. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. Setauket (USA): Exeter Publishing Ltd.
- Rosenberg, N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.
- Siwach, P., S. Jain, N. Saini, V.K. Chowdhury, R.K. Jain. 2004. Allelic diversity among Basmati and non-Basmati long-grain *indica* rice varieties using microsatellite markers. *J Plant Biochem. & Biotech.* 13:25-32.
- Thawaro, S., S. Te-chato. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated in vitro. *Sci Asia* 35:142-149.
- Ting, N., N.M. Zaki, R. Rosli, E.L. Low, M. Ithnin, S. Cheah, S. Tan, R. Singh. 2010. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. *Indian Acad. Sci.* 89(2):135-145.
- Thongthawee, S., P. Tittinutchanon, H. Volkaert. 2010. Microsatellites for parentage analysis in oil palm breeding population. *Thai J Genetics* 3(2):172-181.
- [USDA] United States Department of Agriculture. 2014 July. Oilseeds: world markets and trade. Circular Series FOP 07-14.
- Vigouroux, Y., S. Mitchell, Y. Matsuoaka, M. Hamblin, S. Kresovich, J.S.C. Smith, J. Jaqueth, O.S. Smith, J. Doebly. 2005. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellites. *Genetics*. 169:1617-1630. doi:10.1534/genetics.104.032086.
- Yeh, F.C., R.C. Yang, T. Boyle. 1999. POPGENE Ver 1.31 - Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Edmonton (CA): University of Alberta.
- Zulhermana, Sudarsono, D. Asmono, Yulismawati. 2010. Intra- and Inter-population genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Pisifera clones originated from Nigeria based on SSR markers analysis. (Ed. Siahaan D., Samosir Y., Herawan T., Rahutomo S., Jatmika A., Erwinsyah., Susanto A., Sutarta E.S., Panjaitan F.R., Hasibuan H.A., Idris A.S., Melling L., Schuchardt F., Chanprasert, Ajambang W., Jacquemard J.C.) *International Oil Palm Conference 2010*; 2010 Juni 1-3; Yogyakarta, Indonesia. Medan: IOPRI.