

Skrining Marka SSR Untuk Analisis Diversitas Genetik Aksesori Kelapa Sawit

I MADE TASMA

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian,
Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor 16111
E-mail: imade.tasma@gmail.com

Diterima 7 Januari 2014 / Direvisi 28 Maret 2014 / Disetujui 19 Mei 2014

ABSTRAK

Analisis diversitas genetik memfasilitasi pemilihan tetua untuk program pemuliaan kelapa sawit. Penggunaan marka SSR meningkatkan akurasi dan kecepatan analisis filogenetik aksesori kelapa sawit. Sebagai penanda genetik, marka SSR memiliki keunggulan dibandingkan marka DNA lainnya (AFLP, RAPD, dan RFLP) karena marka SSR polimorfisme alelnya tinggi, bersifat kodominan, berdistribusi hampir merata pada genom, ekonomis dalam pengujiannya, dan mampu mendeteksi keragaman genetik aksesori dengan tingkat kekerabatan dekat. Tujuan dari penelitian ini untuk (1) mendapatkan marka SSR yang dapat digunakan untuk analisis diversitas genetik aksesori-aksesori kelapa sawit; (2) menguji marka SSR terpilih untuk uji diversitas genetik dalam aksesori (*intra accession*), antar aksesori (*inter accessions*), dan antar species (*inter species*) kelapa sawit menggunakan marka mikrosatelit terpilih. Sebanyak 39 marka SSR diuji pada empat genotipe kelapa sawit. Pola pita marka SSR diskor dan tingkat polimorfisme marka dihitung. Marka SSR dipilih berdasarkan tingkat polimorfisme, pola pita, frekuensi dan ukuran alel terdeteksi, dan penyebarannya pada kromosom kelapa sawit. Sepuluh individu tanaman anggota aksesori C103-T (aksesori Tenera asal Kamerun) dan 9 anggota aksesori *E. oleifera* (Eo) asal Amerika Selatan dan 7 aksesori *E. guineensis* (Eg) diuji menggunakan 20 marka SSR terpilih. Dendrogram kekerabatan dibuat dengan metode *Unweighted Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versi 2.1-pc. Hasil penelitian menunjukkan 39 marka SSR memiliki tingkat polimorfisme 75% (berkisar 32-92%), jumlah alel 5,97 (2-14) dengan ukuran alel 119-330 bp. Berdasar tingkat polimorfisme, frekuensi dan ukuran alel dan pola pita tersebut, serta distribusinya yang menyebar merata pada kromosom kelapa sawit, terpilih 20 marka SSR untuk diuji selanjutnya. Marka SSR terpilih ini diuji kemanfaatannya untuk analisis keragaman genetik anggota individu dalam aksesori, individu antar aksesori dalam satu species *Eo* atau *Eg*, dan antar species *Eo* dan *Eg*. Uji filogenetik 20 marka SSR pada 10 individu anggota aksesori C103-T menghasilkan diversitas genetik 14,37-37,38%. Uji 8 individu anggota aksesori *Eo* menunjukkan diversitas genetik 7-15%. Uji diversitas genetik aksesori antar species *Eo* dan *Eg* menghasilkan diversitas genetik sebesar 15-45%. Dengan demikian 20 marka SSR terpilih dapat membedakan dengan sangat jelas anggota individu dalam aksesori, anggota aksesori dalam suatu species, dan anggota aksesori antar species kelapa sawit. Marka SSR terpilih dapat digunakan untuk uji kekerabatan berbagai aksesori kelapa sawit. Hasil studi ini bermanfaat untuk penanganan plasma nutfah di lapang dan pemilihan calon tetua untuk program pemuliaan kelapa sawit.

Kata kunci : Kelapa sawit, aksesori, keragaman genetik, marka SSR, uji kekerabatan.

ABSTRACT

SSR Marker Selection for Genetic Diversity Analysis of Oil Palm Accessions

Genetic diversity analysis of oil palm accessions facilitates parent selection in a breeding program. The use of SSR markers enhances the accuracy and speed of oil palm phylogenetic analysis. SSR is a superior PCR-based genetic marker compared to other developed markers (e.g. AFLP, RAPD, and RFLP) due to its multi allelic nature, codominant characteristic, well-distributed across the plant genome, its economic assays, and high ability in differentiating closely related plant genetic materials. The objectives of this study were to: (1) select the SSR markers appropriate for oil palm accession diversity analysis; (2) analyze the selected markers to be used in genetic relationship studies both in analyzing within- and among- oil palm accessions as well as inter oil palm species. A total of 39 SSR markers were initially used in this study. The appropriate SSR markers were selected based on their polymorphism level, banding pattern, allele frequency and size, together with their distributions across the oil palm genome. The selected markers were used in the phylogenetic analysis studies involving genetic materials within- and among-oil palm accessions. These included 10 individual plants of the C103-T accession (within accession study), 9 accessions of *Eo* and 7 accessions of *Eg* (for inter-oil palm accessions and inter species studies). Dendograms were constructed based on *Unweighted Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA) using the *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS) software version 2.1-pc. Results showed that the 39 SSR markers showed polymorphism level of 75% (ranges from 32 to 92%), allele number of 5.97 (2-14), and allele size of 119-330 bp. Based on the observed polymorphism level, allele size and frequency, banding pattern, and their distributions across the oil palm genome, 20 SSR markers were selected to be studied further. The selected SSR markers were tested their robustness to be used in the phylogenetic analyses of individual plants within an accession, among accessions of a species (*Eo* or *Eg*) as well as the individuals among oil species *Eo* and *Eg*. Phylogenetic analysis of 20 SSR markers on 10 individual plant within a Cameroon originated accession C103-T resulted genetic diversity of 14.37-37.38%. Diversity level of 8 accessions within species *Eo* was 7-15%. Analysis of inter species diversity *Eo* and *Eg* demonstrated diversity level of 5-45%. The observation results indicated that

the 20 SSR markers were robust enough to be used in phylogenetic studies of oil palm accessions. The results shown by this study would be very useful in handling the oil palm germplasm in the field and should facilitate parent selection in a breeding program

Keywords: Oil palm, accession, genetic diversity, SSR markers, phylogenetic studi.

PENDAHULUAN

Keragaman plasma nutfah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Indonesia masih rendah dan program pemuliaan sawit umumnya menggunakan materi genetik dengan keragaman genetik yang terbatas. Oleh karena itu, diperlukan pengayaan plasma nutfah dari berbagai sumber. Pada beberapa tahun terakhir Indonesia telah melakukan eksplorasi SDG sawit dari sumber keragaman di Afrika diantaranya dari Kamerun, Angola dan Nigeria.

Fenomena pemanasan global menuntut pemulia sawit untuk melakukan pemuliaan karakter-karakter yang lebih beragam khususnya daya adaptasi tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik yang lebih kompleks. Selain itu, diperlukan varietas baru dengan kecepatan pertumbuhan batang lambat sehingga memudahkan panen dengan masa produktif lebih panjang, serta kualitas minyak yang lebih sehat. Tantangan ini memerlukan peningkatan variabilitas genetik plasma nutfah sawit yang saat ini sangat terbatas khususnya untuk species *E. guineensis* (Pamin, 1998; Hayati *et al.*, 2004).

Pemanfaatan species lain seperti *E. oleifera* akan meningkatkan keragaman genetik plasma nutfah sawit untuk program pemuliaan. Kedua species ini *E. guineensis* dan *E. oleifera* dapat disilangkan dengan menghasilkan biji yang fertil (Pamin 1998; Zaki *et al.*, 2012) sehingga introgresi karakter dapat dilakukan dengan teknik silang balik. *E. oleifera* mempunyai keunggulan karakter agronomi sebagai sumber gen ketahanan penyakit layu Fusarium, kecepatan pertumbuhan batang lambat (Zaki *et al.* 2012; Tasma *et al.*, 2013), dan kualitas minyak yang lebih baik dengan kandungan asam linolenat, asam oleat, karoten dan nilai iodine tinggi serta kandungan asam palmitat rendah (Choo dan Yusof 1996; Hayati *et al.*, 2004).

Potensi penggunaan marka molekuler sebagai alat untuk melakukan karakterisasi genetik tanaman telah dikenal sejak puluhan tahun lalu. 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 atau sebagai petunjuk untuk melakukan pemuliaan tanaman kelapa sawit. Pemuliaan menggunakan marka DNA untuk identifikasi genotipe sawit, galur, varietas dan kultivar

untuk melihat kemurnian benih, memecahkan ketidakpastian tetua, dan juga untuk perlindungan varietas tanaman telah dikembangkan melalui identifikasi individu.

Marka SSR adalah salah satu marka molekuler sederhana yang paling populer dan paling banyak digunakan karena berbagai kelebihanannya dibandingkan dengan jenis marka lainnya. Marka SSR terdiri dari sekuen-sekuen DNA dengan unit ulangan yang pendek (1-6 bp) merupakan tipe umum repetitif DNA yang sering disebut dengan mikrosatelit (Singh *et al.*, 2008; Ting *et al.*, 2010). Variabilitas mikrosatelit terjadi karena variasi dalam jumlah ulangan pada sekuen intinya. Tingkat variabilitas berkorelasi positif dengan panjang ulangan sekuennya (Singh *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 1992; Billotte *et al.*, 2005). Mikrosatelit sangat bermanfaat sebagai penanda genetik karena bersifat kodominan, memiliki polimorfisme alel sangat tinggi, lokasinya yang berdistribusi pada seluruh genom, mampu mendeteksi keragaman genetik pada tanaman yang memiliki tingkat kekerabatan yang dekat dan ekonomis dalam pengujiannya (McCouch *et al.*, 2002; Luyindula *et al.*, 2005; Billotte *et al.*, 2010; Ting *et al.*, 2010).

Marka SSR juga merupakan marka molekuler yang paling menjanjikan untuk studi struktur populasi kelapa sawit (Singh *et al.*, 2008; Billotte *et al.*, 2010). Peta genetik marka SSR pada kelapa sawit telah dikonstruksi dan marka SSR ini telah banyak digunakan untuk karakterisasi berbagai koleksi plasma nutfah kelapa sawit serta pemetaan *quantitative trait loci* (Billotte *et al.*, 2005; Billotte *et al.*, 2010).

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). Dalam program pemuliaan tanaman, pendugaan hubungan genetik sangat berguna untuk mengelola plasma nutfah, identifikasi kultivar, membantu seleksi tetua untuk persilangan, serta mengurangi jumlah individu yang dibutuhkan untuk pengambilan sampel dengan kisaran keragaman genetik yang luas (Feng *et al.*, 2009; Ajabang *et al.*, 2012).

Tujuan dari penelitian ini untuk (1) mendapatkan marka SSR yang dapat digunakan untuk

analisis filogenetik aksesori-aksesori kelapa sawit; (2) menguji marka SSR terpilih untuk uji diversitas genetik dalam aksesori (*intra accession*), antar aksesori (*inter accessions*), dan antar species (*inter species*) kelapa sawit menggunakan marka mikrosatelit terpilih. Marka SSR terpilih dari hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk penanganan plasma nutfah kelapa sawit yang efisien, efektif, dan berdaya guna serta memfasilitasi dalam pemilihan calon tetua untuk program pemuliaan kelapa sawit.

BAHAN DAN METODE

Penelitian skrining marka SSR dan uji kekerabatan berbagai aksesori kelapa sawit ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Bogor, dari bulan Januari sampai dengan bulan Desember 2012.

Materi genetik

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari empat genotipe kelapa sawit *E. guineensis* asal Kamerun tipe Dura yang ditanam di Kebun Koleksi Plasma Nutfah Kelapa Sawit Sijunjung, Sumatera Barat. Empat genotipe ini digunakan untuk menguji 39 pasang primer SSR yang menghasilkan pita dan tingkat polimorfisme yang sesuai untuk uji diversitas genetik sawit. Sebanyak 10 individu tanaman yang merupakan anggota aksesori C103-T kelapa sawit asal Kamerun, Afrika digunakan untuk analisis diversitas genetik di dalam aksesori (*intra accession phylogenetic study*). Sebanyak 7 aksesori kelapa sawit *E. guineensis* tipe Tenera yang telah beradaptasi di Indonesia ditanam di KP. Citayam, Bogor, Jawa Barat, hasil eksplorasi plasma nutfah kelapa sawit tahun 2010 digunakan untuk uji diversitas antar aksesori (*inter accessions*) species *E. guineensis*. Pada penelitian ini juga digunakan sampel daun dari 9 aksesori *E. oleifera* kerabat dekat dari *E. guineensis* koleksi PPKS Medan di Kebun Dolok Sinumbah, Marihat, Sumatera Utara. Uji kekerabatan antar species yang melibatkan 7 aksesori *E. guineensis* dan 9 aksesori *E. oleifera* dilakukan untuk menguji kemanfaatan marka SSR terpilih dalam studi kekerabatan kelapa sawit. Aksesori-aksesori di atas diuji diversitas genetiknya menggunakan 20 marka SSR terpilih yang distribusinya menyebar merata pada genom kelapa sawit. Pada setiap kromosom sawit telah diwakili setidaknya oleh satu atau dua marka SSR. Dua puluh marka SSR memiliki tingkat polimorfisme sedang sampai tinggi digunakan pada uji kekerabatan aksesori-aksesori kelapa sawit di atas (Tabel 1).

Isolasi DNA genomik

Isolasi DNA genomik dilakukan menggunakan metode CTAB mengikuti protokol di desain khusus untuk tanaman bergetah (Michiels *et al.*, 2003) yang dimodifikasi. Metode detail isolasi DNA telah dilaporkan sebelumnya (Satyawan dan Tasma 2011). *Deoxyribonucleic Acid* dilarutkan dengan bufer TE 1x sebanyak 150 µL. Uji kualitas DNA genomik dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa (Sambrook *et al.*, 1989) menggunakan gel agarosa 0,8%. Uji kuantitas DNA dilakukan dengan spektrofotometer Nanodrop (Thermo Scientific, AS).

Skrining primer marka SSR

Skrining primer bertujuan untuk memperoleh pasangan-pasangan primer dengan polimorfisme sedang sampai tinggi dan dapat diskor dengan baik dan pola pitanya konsisten (*reliable*). Sebanyak 39 pasang primer mix (Tabel 1) digunakan pada studi ini. Skrining primer dilakukan menggunakan DNA dari empat aksesori kelapa sawit asal Kamerun (Afrika), yaitu: C-02, C-26, C-44, dan C-56. Dua program PCR *touchdown* (TD) 60-50°C dan TD55-45°C digunakan pada penelitian ini dengan tahapan proses PCR kedua program *touchdown* seperti dilaporkan oleh Tasma *et al.* (2011) yang dilakukan menggunakan mesin PCR MJ Research. *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) hasil amplifikasi kemudian dipisahkan menggunakan 5% *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) pada 0.5 x bufer TBE menggunakan Vertical SesquiGen GT 38 x 30 dari Bio Rad (Bio Rad, Hercules, California, AS) dan gel kemudian diwarnai menggunakan metode *silver staining* mengikuti protokol standar (Sambrook *et al.*, 1989). *Deoxyribonucleic Acid* yang telah dipisahkan diambil gambarnya menggunakan Chemi Doc gel scanning dari Bio Rad (Bio Rad, Hercules, California, AS). Pita DNA kemudian diskor ada tidaknya pita dan profil DNA diterjemahkan ke dalam data biner.

Amplifikasi 20 marka SSR pada berbagai aksesori kelapa sawit

Sebanyak 20 primer hasil skrining primer di atas digunakan untuk amplifikasi DNA anggota aksesori maupun berbagai aksesori sawit (Tabel 2). Tiga set aksesori kelapa sawit diuji pada penelitian ini. Pertama 7 aksesori kelapa sawit *E. guineensis* tipe Tenera yang sudah beradaptasi baik di Indonesia hasil eksplorasi kelapa sawit tahun 2010. Yang kedua adalah 10 individu kelapa sawit anggota dari aksesori sawit asal Kamerun C103-T. Yang ketiga 9 aksesori dari spesies *Eo.* Reaksi PCR dengan volume 10 µL dilakukan menggunakan RBC *taq polymerase* (RBC, Inc., Canada). Program PCR yang digunakan adalah TD 60_50, dan TD 55_45 seperti yang dilaporkan sebelumnya (Tasma *et al.*, 2011).

Tabel 1. Karakteristik primer 39 marka SSR (Billote 2005) yang digunakan pada penelitian ini diuji menggunakan 4 aksesi kelapa sawit asal Kamerun, Afrika.

Table 1. SSR marker primer characteristics (Billote 2005) used in this study analyzed using four oil palm genotypes originated from Cameroon, Africa.

No.	Nama Primer Primer name	Urutan Primer (5'-3') Primer sequence	Tm ^a (°C)
1.	LG 1 3782	F: 5'-TTTTACAACAACCCAGAGA-3' R: 5'-GTTACCTGAGCTTGTGTTATC-3'	48 51
2.	LG 1 0399	F: 5'-CGAGGCCCAAAACATTAC-3' R: 5'-GGTCCCGATCCCGTCTACTG-3'	52 58
3.	LG 1 0874	F: 5'-TCCAGTTGTCGAGTTGTAGT-3' R: 5'-ATTATGGGGTTATGCTTTCA-3'	50 46
4.	LG 2 0793	F: 5'-GTACTTCGCAACTATTCCTTTTCTT-3' R: 5'-AGTTGATCGTGGTGCCTGAC-3'	53 54
5.	LG 2 0800	F: 5'-GTGGGACAATTGAAAGGGAAGT-3' R: 5'-CCAGCTGCCAATGTTGTAG-3'	53 54
6.	LG 3 0882	F: 5'-TTGATCTTAGACATAATATACTGTA-3' R: 5'-AAAGCGCGTAATCTCATAGT-3'	49 48
7.	LG 3 2347	F: 5'-ATTTTGCATGTGTTGAGAGC-3' R: 5'-CAACCAATTGCACCCTAAAG-3'	48 50
8.	LG 4 3526	F: 5'-GGGAGAGGAAAAATAGAG-3' R: 5'-CCTCCCTGAGACTGAGAAG-3'	47 53
9.	LG 4 0059	F: 5'-TGCAGGGGATGCTTTTATT-3' R: 5'-CCCTTAATTCCTGCCTTATT-3'	47 48
10.	LG 4 1716	F: 5'-CAGCAGTAGTTAATAACTTAAA-3' R: 5'-AGTCAGAGCACCTAATACAT-3'	46 48
11.	LG 5 3902	F: 5'-ACAATAACCTGAGACAACAAGAAAC-3' R: 5'-ATACATCCCCTCCCCTCTCT-3'	53 54
12.	LG 5 2813	F: 5'-GCTTTGTTGCAGTTTGACTA-3' R: 5'-GTTTAGGATGTTGCGTGAT-3'	48 47
13.	LG 6 0195	F: 5'-CCCACCACCCCTAGCTTCTC-3' R: 5'-ACCCCGGTCCAAATAAAATC-3'	58 50
14.	LG 6 0783	F: 5'-GAATGTGGCTGTAAATGTCGAGTG-3' R: 5'-AAGCCGCATGGACAACCTAGTAA-3'	56 56
15.	LG 7 3287	F: 5'-TTGGTGAGCCATTTGCTACA-3' R: 5'-CCTCCTTCCATTTTCTACT-3'	50 56
16.	LG 7 0894	F: 5'-TGCTTCTTGCTTGCTGATACA-3' R: 5'-CCACGTCTACGAAATGATAA-3'	48 48
17.	LG 8 0555	F: 5'-TACCATCACTGACCAATAAC-3' R: 5'-GTCTTTCTTGCTAACTACAC-3'	48 48
18.	LG 8 0778	F: 5'-TTCGTTATCCAAACCATATCTTAT-3' R: 5'-CCTCAAAGAGTATTGGATGTCTAT-3'	49 53
19.	LG 8 3732	F: 5'-ATTTTATTTGGCTTGGTATA-3' R: 5'-ACTTTTCTATCTAATTCTTGAGAT-3'	42 48
20.	LG 9 2188	F: 5'-CGAAGTTGTTGGACATG-3' R: 5'-TTCCATCACAGGAGATATAG-3'	45 48
21.	LG 9 3663	F: 5'-AGCAAAATGGCAAAGGAGAG-3' R: 5'-GGTGTGTGCTATGGAAGATCATAGT-3'	50 56
22.	LG 9 0844	F: 5'-GCCGTTCAAGTCAATTAGAC-3' R: 5'-TTTGGGAGCAAGCATAATCA-3'	50 48
23.	LG 10 0146	F: 5'-GACCTTTGTCAGCATACTTGGTGTG-3' R: 5'-GCAGGCCTGAAATCCCAAAT-3'	58 52
24.	LG 10 0445	F: 5'-CCTTATATCGCACGGGTTCC-3' R: 5'-TTCTTGGGGTCTCGCTACGG-3'	54 56
25.	LG 11 3755	F: 5'-GCTCACCAAAAAGTGTTAAGTC-3' R: 5'-AGTTTCAACGGCAGGTATAT-3'	52 48
26.	LG 11 0878	F: 5'-CAAAGCAACAAAGCTAGCTAGTA-3' R: 5'-CAAGCAACCTCCATTTAGAT-3'	50 48
27.	LG 11 3722	F: 5'-GGCAGGTAGGTTAGATGAT-3' R: 5'-GAGTTGAAAGAAAAGGAGTG-3'	50 48

Lanjutan Table 1.
Continues Table 1

No.	Nama Primer Primer name	Urutan Primer (5'-3') Primer sequence	Tm ^a (°C)
28.	LG 12 3672	F: 5'-AAAGCCATTCCAGACTAC-3'	46
		R: 5'-CTCATAGCCTTTGTTGTGT-3'	47
29.	LG 12 0790	F: 5'-TTGGTGGTCCTTTTGAATATC-3'	49
		R: 5'-ACAAACCCAGCACTTAAATAAC-3'	50
30.	LG 13 0832	F: 5'-CTCCGATGGTCAAGTCAGA-3'	51
		R: 5'-AAATGGGGAAGGCAATAGTG-3'	50
31.	LG 13 2569	F: 5'-TAGCCGCACTCCCACGAAGC-3'	58
		R: 5'-CCAGAATCATCAGACTCGGACAG-3'	57
32.	LG 14 3350	F: 5'-GGAATAAAGCTTCCAACAAC-3'	48
		R: 5'-CCTGGTCGTTTGGTAGAG-3'	51
33.	LG 14 2427	F: 5'-GAAGGGGCATTGGATTT-3'	45
		R: 5'-TACCTATTACAGCGAGAGTG-3'	50
34.	LG 15 3534	F: 5'-TGAGAAGGAGATGTGAGACT-3'	50
		R: 5'-TCTCCTCAAAACCAAGATAC-3'	48
35.	LG 15 3593	F: 5'-GTGAATGAACGGAAAGATAGT-3'	48
		R: 5'-CCACTTAGAGGTAAAACAACAG-3'	51
36.	LG 15 3402	F: 5'-GGGCTTTCATTTCCACTAT-3'	48
		R: 5'-GCTCAACCTCATCCACAC-3'	50
37.	LG 16 3298	F: 5'-GACTACCGTATTGCGTTTCA-3'	52
		R: 5'-GGTTTTGGTTTCGTGGAG-3'	47
38.	LG 16 2436	F: 5'-AACACTCCAGAAGCCAGGTC-3'	54
		R: 5'-GGTTTAGGTATTGGAAGTATTAGAC-3'	54
39.	LG 16 0782	F: 5'-CGTTCATCCACACCTTTC-3'	54
		R: 5'-GCTGCGAGGCCACTGATAC-3'	55

^aTm=melting temperature tiap primer SSR yang digunakan pada penelitian ini.

Elektroforesis dan penyekoring pita DNA

Deoxyribonucleic Acid hasil amplifikasi kemudian dipisahkan menggunakan 5% *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) pada 0.5 X bufer TBE menggunakan Vertical SesquiGen GT 38 x 30 dari Bio Rad (Bio Rad, Hercules, California, AS) dan gel kemudian diwarnai menggunakan metode *silver staining* mengikuti protokol standar (Sambrook *et al.*, 1989). *Deoxyribonucleic Acid* yang telah dipisahkan diambil gambarnya menggunakan Chemi Doc gel scanning dari Bio Rad (Bio Rad, Hercules, California, AS). Evaluasi dari pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil elektroforesis diskor secara manual. *Scoring data* pita DNA dilakukan oleh dua orang secara independen. Kriteria penskoran berdasarkan ada atau tidaknya alel yang muncul. Skor 1 diberikan apabila muncul pita DNA yang teramplifikasi dari aksesori sawit yang diuji, sedangkan skor 0 diberikan apabila tidak ada pita DNA yang teramplifikasi untuk pita SSR yang sama.

Analisis Data

Setiap pita SSR dalam gel yang merepresentasikan fragmen DNA dari setiap genotipe tanaman diberi nilai satu ketika pita muncul dan diberi nilai nol ketika pita tidak muncul. Kemiripan genetik

antar genotipe dihitung menggunakan metode Rohlfs (2000), nilai PIC (*polymorphism information content*) ditentukan menggunakan metode Smith *et al.* (1997), dan analisis pengelompokan (*cluster analysis*) dilakukan menggunakan metode UPGMA dari program NTSYS 2.1-pc (Rohlf, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining marka SSR pada empat genotipe kelapa sawit

Hasil penelitian *primer screening* dari 39 pasang primer SSR pada empat aksesori plasma nutfah kelapa sawit asal Kamerun disajikan pada Tabel 2. Pengujian ini menghasilkan sebanyak 233 alel dengan jumlah alel per lokus SSR 5,67 berkisar antara 2-14 alel per lokus SSR. Ukuran alel yang terdeteksi berkisar antara 119-330 bp. Tingkat polimorfisme dari 39 marka SSR yang diuji cukup tinggi dengan rata-rata nilai PIC 0,75 berkisar antara 0,32-0,92 (Tabel 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai PIC berkisar antara 32-92%, yang berarti bahwa ada beberapa pilihan primer yang memiliki nilai polimorfisme tinggi dan Tabel 2. Jumlah, ukuran alel, dan PIC *value* 39 marka SSR yang digunakan pada skrining primer menggunakan empat genotipe kelapa sawit asal

Tabel 2. Jumlah, ukuran alel, dan PIC value 39 marka SSR yang digunakan pada skrining primer menggunakan empat genotipe kelapa sawit asal Kamerun (C-04, C-26, C-44, C-56)

Table 2. Allele number and sizes, PIC values of the 39 SSR markers used in the primer screening study analyzed using four oil palm genotypes (C-04, C-26, C-44, C-56) originated from Cameroon, Afrika.

No.	Marka SSR SSR marker	Kromosom Chromosome	Jumlah alel Allele number	Ukuran alel (bp) Allele size	Nilai PIC ^a PIC value
1.	LG 1 3782	1	3	250-290	0,63
2.	LG 1 0399	1	2	250-290	0,32
3.	LG 1 0874	1	3	250-290	0,63
4.	LG 2 0793	2	5	218-260	0,78
5.	LG 2 0800	2	6	220-265	0,80
6.	LG 3 0882	3	10	150-175	0,88
7.	LG 3 2347	3	6	153-177	0,79
8.	LG 4 3526	4	6	210-130	0,78
9.	LG 4 0059	4	11	175-194	0,88
10.	LG 4 1716	4	7	150-170	0,84
11.	LG 5 3902	5	8	135-148	0,86
12.	LG 5 2813	5	5	200-220	0,75
13.	LG 6 0195	6	12	235-300	0,90
14.	LG 6 0783	6	2	270-300	0,38
15.	LG 7 3287	7	3	275-321	0,59
16.	LG 7 0894	7	5	260-330	0,78
17.	LG 8 0555	8	10	200-255	0,88
18.	LG 8 0778	8	5	168-200	0,78
19.	LG 8 3732	8	4	170-200	0,72
20.	LG 9 2188	9	14	140-175	0,92
21.	LG 9 3663	9	5	228-242	0,77
22.	LG 9 0844	9	6	230-242	0,79
23.	LG 10 0146	10	2	244-295	0,49
24.	LG 10 0445	10	4	230-275	0,72
25.	LG 11 3755	11	4	244-295	0,72
26.	LG 11 0878	11	5	170-200	0,78
27.	LG 11 3722	12	4	220-245	0,72
28.	LG 12 3672	12	11	169-194	0,89
29.	LG 12 0790	12	5	200-250	0,72
30.	LG 13 0832	13	2	135-160	0,38
31.	LG 13 2569	14	10	250-290	0,88
32.	LG 14 3350	14	5	250-295	0,76
33.	LG 14 2427	14	7	112-152	0,84
34.	LG 15 3534	15	11	200-250	0,90
35.	LG 15 3593	15	3	155-195	0,61
36.	LG 15 3402	15	14	197-285	0,91
37.	LG 16 3298	16	5	119-162	0,78
38.	LG 16 2436	16	7	155-202	0,84
39.	LG 16 0782	16	11	158-200	0,88
Rata-rata (nilai kisaran) Average (range values)		-	5,97 (2-14)	119-330	0,75 (0,32-0,92)

^aPIC = Polymorphism Information Content.

Kamerun (C-04, C-26, C-44, C-56) dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Selain itu, jumlah alel yang dihasilkan dari masing-masing pasangan primer yang diuji pada empat genotipe kelapa sawit sebanyak 5,97 alel berkisar antara 2-14 alel per lokus SSR. Nilai ini masih lebih tinggi daripada penelitian sebelumnya mengenai keragaman kelapa sawit tipe

Dura dengan marka SSR yang bervariasi antara 2-3,5 alel per lokus (Putri *et al.*, 2011) dan 2-6 alel per lokus pada uji diversitas genetik aksesori sawit asal Kamerun (Tasma *et al.*, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan pada penelitian ini polimorfismenya lebih tinggi. Semakin banyak pita DNA polimorfik keragaman genetik sampel semakin tinggi

karena semakin banyak situs penempelan primer pada genom tanaman (Zulhermana, 2009).

Primer dipilih berdasarkan nilai polimorfisme (PIC value) marka SSR dengan kisaran 0,50-0,90. Selain itu, hasil visualisasi juga berpengaruh dalam pemilihan primer. Primer yang dipilih sebaiknya memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi, serta kemunculan DNA yang teramplifikasi dengan jelas pada hasil elektroforesis. Primer yang mudah diskor akan menghasilkan data yang representatif dan dapat dipercaya. Primer yang dipilih harus berdistribusi secara merata pada seluruh genom sawit dan setiap kromosom hendaknya terwakili setidaknya oleh satu marka SSR. Dengan demikian marka SSR yang dipilih mewakili seluruh genom dan berdistribusi secara merata pada setiap kromosom kelapa sawit. Berdasarkan hal tersebut, terpilih sebanyak 20 primer yang memenuhi syarat untuk uji kekerabatan genetik. Marka SSR tersebut, yaitu: LG 1 3782, LG 2 0800, LG 3 0882, LG 3 2347, LG 4 0059, LG5 2813, LG 6 0195, LG 7 3287, LG 8 0555, LG 9 2188, LG 10 0445, LG 11 3755, LG 11 0878, LG 12 3672, LG 13 2569, LG 14 2427, LG 15 3534, LG 15 3402, LG 16 3298, dan LG 16 0782.

Analisis filogenetik 10 individu tanaman anggota aksesori C103-T menggunakan 20 marka SSR

Analisis diversitas 10 individu tanaman anggota aksesori C103-T asal Kamerun (*intra accession phylogenetic analysis*) dilakukan menggunakan 20 marka SSR hasil skrining marka SSR. Hasil analisis menunjukkan diperoleh jumlah alel per lokus SSR sebanyak 6 alel dengan kisaran 4-12 alel per lokus SSR (Tabel 3). Ukuran alel yang terdeteksi berkisar antara 119-321 bp. Jumlah alel terdeteksi sangat erat kaitannya dengan variasi jumlah ulangan mikrosatelit yang dapat dideteksi menggunakan elektroforesis sehingga dapat diketahui fragmen DNA yang berbeda antara satu nukleotida dengan nukleotida yang lain (Rohrer *et al.*, 1994). Elektroforesis gel akrilamid dengan jenis *native gel* menggunakan pewarnaan perak sehingga hasil yang ditunjukkan lebih sensitif (Mulyadiana 2010). Tingkat polimorfisme yang dihasilkan dari analisis individu dalam satu aksesori sawit (*intra accession polymorphism analysis*) ini menghasilkan rata-rata nilai PIC 0,73 berkisar antara 0,49-0,87 (Tabel 3). Nilai ini sedikit lebih rendah dengan rata-rata nilai PIC pada skrining marka SSR menggunakan 39 marka SSR diuji pada empat aksesori sawit sebesar 0,75 (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa cukup keragaman tersedia dalam individu anggota suatu aksesori sawit asal Kamerun. Implikasinya adalah untuk melakukan analisis kekerabatan aksesori-aksesori sawit asal Kamerun tersebut mungkin tidak cukup diwakili oleh satu individu anggota aksesori dan analisis sebaiknya melibatkan beberapa

tanaman anggota aksesori tersebut dan dianalisis secara bersamaan.

Analisis filogenetik kesepuluh individu tanaman anggota aksesori C103-T memberikan nilai diversitas genetik 14,75-30% (Tabel 4, Gambar 1). Pada tingkat diversitas genetik 30% membagi individu tanaman anggota aksesori C103-T menjadi 4 kelompok. Kelompok I terdiri dari 5 anggota (C103-T5, C103-T6, C103-T8, C103-T9, dan C103-T10). Kelompok II terdiri dari satu anggota aksesori (C103-T4), kelompok III dua anggota aksesori (C103-T3 dan C103-T7), dan kelompok IV dua anggota aksesori (C103-T1 dan C103-T2).

Semakin banyak pita DNA polimorfik keragaman genetik sampel semakin tinggi karena semakin banyak situs penempelan primer pada genom tanaman (Zulhermana, 2009). Primer dipilih berdasarkan nilai polimorfisme (PIC value) marka SSR dengan kisaran 0,50-0,90. Selain itu, hasil visualisasi juga berpengaruh dalam pemilihan primer. Primer yang dipilih sebaiknya memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi, serta kemunculan DNA yang teramplifikasi dengan jelas pada hasil elektroforesis. Primer yang mudah diskor akan menghasilkan data yang representatif dan dapat dipercaya. Primer yang dipilih mesti juga berdistribusi secara merata pada seluruh genom sawit dan setiap kromosom hendaknya terwakili setidaknya oleh satu marka SSR. Dengan demikian marka SSR yang dipilih mewakili seluruh genom dan berdistribusi secara merata pada setiap kromosom kelapa sawit. Berdasarkan hal tersebut, terpilih sebanyak 20 primer yang memenuhi syarat untuk uji kekerabatan genetik. Marka SSR tersebut, yaitu: LG 1 3782, LG 2 0800, LG 3 0882, LG 3 2347, LG 4 0059, LG5 2813, LG 6 0195, LG 7 3287, LG 8 0555, LG 9 2188, LG 10 0445, LG 11 3755, LG 11 0878, LG 12 3672, LG 13 2569, LG 14 2427, LG 15 3534, LG 15 3402, LG 16 3298, dan LG 16 0782.

Analisis filogenetik 10 individu tanaman anggota aksesori C103-T menggunakan 20 marka SSR

Analisis diversitas 10 individu tanaman anggota aksesori C103-T asal Kamerun (*intra accession phylogenetic analysis*) dilakukan menggunakan 20 marka SSR hasil skrining marka SSR. Hasil analisis menunjukkan diperoleh jumlah alel per lokus SSR sebanyak 6 alel dengan kisaran 4-12 alel per lokus SSR (Tabel 3). Ukuran alel yang terdeteksi berkisar antara 119-321 bp. Jumlah alel terdeteksi sangat erat kaitannya dengan variasi jumlah ulangan mikrosatelit yang dapat dideteksi menggunakan elektroforesis sehingga dapat diketahui fragmen DNA yang berbeda antara satu nukleotida dengan nukleotida yang lain (Rohrer *et al.*, 1994). Elektroforesis gel akrilamid dengan jenis *native gel* menggunakan pewarnaan perak sehingga

hasil yang ditunjukkan lebih sensitif. Tingkat polimorfisme yang dihasilkan dari analisis individu dalam satu aksesori sawit (*intra accession polymorphism analysis*) ini menghasilkan rata-rata nilai PIC 0,73 berkisar antara 0,49-0,87 (Tabel 3). Nilai ini sedikit lebih rendah dengan rata-rata nilai PIC pada skrining marka SSR menggunakan 39 marka SSR diuji pada empat aksesori sawit sebesar 0,75 (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa cukup keragaman tersedia dalam individu anggota suatu aksesori sawit asal Kamerun. Implikasinya adalah untuk melakukan analisis kekerabatan aksesori-aksesori sawit asal Kamerun tersebut mungkin tidak cukup diwakili oleh satu individu anggota aksesori dan analisis sebaiknya melibatkan beberapa tanaman anggota aksesori tersebut dan dianalisis secara bersamaan.

Analisis filogenetik kesepuluh individu tanaman anggota aksesori C103-T memberikan nilai diversitas genetik 14,75-30% (Tabel 4; Gambar 1). Pada tingkat diversitas genetik 30% membagi individu tanaman anggota aksesori C103-T menjadi 4 kelompok. Kelompok I terdiri dari 5 anggota (C103-T5, C103-T6, C103-T8, C103-T9, dan C103-T10). Kelompok II terdiri dari satu anggota aksesori (C103-T4), kelompok III dua anggota aksesori (C103-T3 dan C103-T7), dan kelompok III dua anggota aksesori

(C103-T1 dan C103-T2).

Analisis filogenetik 16 aksesori antar species kelapa sawit (*inter-species phylogenetic analysis*) menggunakan 20 marka SSR

Analisis PCR 20 marka SSR hasil skrining marka SSR menggunakan 16 aksesori kelapa sawit menunjukkan pola pita dengan polimorfisme beragam (Tabel 5). Marka SSR yang diuji menunjukkan polimorfisme yang tinggi dengan rata-rata nilai *polymorphism information content* (PIC *value*) 0,81 berkisar antara 0,69-0,89 (Tabel 5). Rataan jumlah alel yang terdeteksi dari setiap marka SSR hasil amplifikasi pada 16 aksesori sawit sebanyak 8,45 alel per marka SSR berkisar antara 4-12 alel per lokus SSR (Tabel 5). Nilai PIC ini sejalan dengan penelitian sebelumnya pada tanaman kedelai dimana marka SSR menunjukkan tingkat polimorfisme di atas 50% (Tasma *et al.*, 2001; Tasma *et al.*, 2011). Hasil penelitian ini juga sesuai untuk kelapa sawit yang merupakan tanaman menyerbuk silang dimana nilai PIC dan jumlah alel yang terdeteksi pada penelitian ini marka SSR umumnya menunjukkan nilai PIC di atas 60% dan jumlah alel per lokus lebih dari 5 alel per lokus SSR (Billote *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007).

Tabel 3. Profil 20 marka SSR yang diamplifikasi pada DNA 10 individu tanaman anggota dari satu aksesori sawit asal Kamerun C103-T (analisis filogenetik intra aksesori).

Table 3. The profile of 20 SSR markers that were amplified on DNA of 10 individual plant members of the accession C103-T (*intra accession phylogenetic analysis*).

Marka SSR SSR marker	Jumlah Alel Allele number	Ukuran Alel (bp) Allele size	Nilai PIC ^a PIC Value
LG 1 3782	4	258-290	0,60
LG 2 0800	4	220-265	0,49
LG 3 0882	4	150-170	0,70
LG 3 2347	6	153-177	0,81
LG 4 0059	5	170-195	0,70
LG 5 2813	4	200-212	0,68
LG 6 0195	5	235-290	0,74
LG 7 3287	4	290-321	0,62
LG 8 0555	8	200-255	0,81
LG 9 2188	5	145-169	0,64
LG 10 0445	4	230-275	0,70
LG 11 3755	4	250-295	0,83
LG 11 0878	9	170-200	0,69
LG 12 3672	7	169-194	0,75
LG 13 2569	5	250-285	0,73
LG 14 2427	9	123-152	0,83
LG 15 3534	8	210-250	0,83
LG 15 3402	7	210-285	0,77
LG 16 3298	12	119-162	0,87
LG 16 0782	6	158-240	0,79
Rata-rata (nilai kisaran) Average (range value)	6 (4-12)	119-321	0,73 (0,49-0,87)

^aPIC = Polymorphism Information Content.

Tabel 4. Koefisien kesamaan 10 individu anggota aksesori 103-T (uji individu dalam satu aksesori) kelapa sawit asal Kamerun diuji menggunakan 20 marka SSR.

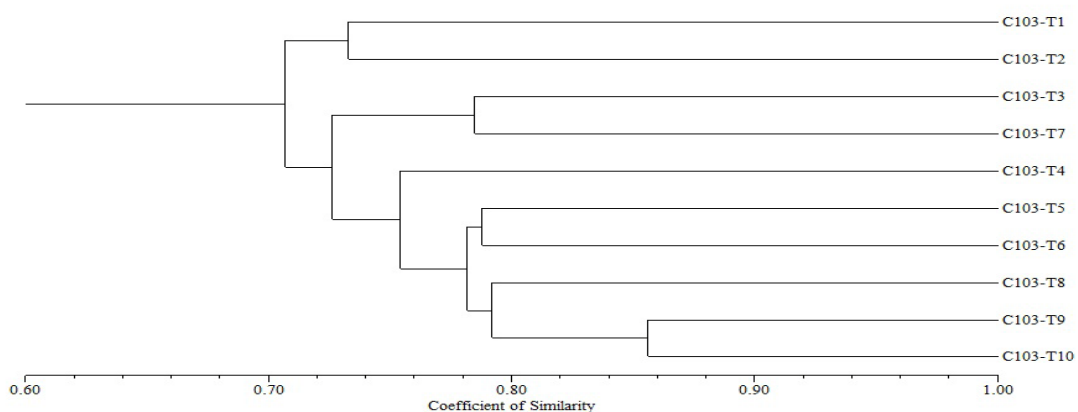
Table 4. Similarity coefficients of the 10 individual plant members of the oil palm accession C103-T (within an accession phylogenetic analysis) analyzed using 20 SSR markers.

Anggota aksesori Accession member	103-T1	103-T2	103-T3	103-T4	103-T5	103-T6	103-T7	103-T8	103-T9	103-T10
103-T1	1,00000									
103-T2	0,73267	1,00000								
103-T3	0,67327	0,71605	1,00000							
103-T4	0,71287	0,70667	0,73125	1,00000						
103-T5	0,69149	0,74839	0,73939	0,77778	1,00000					
103-T6	0,66337	0,70370	0,73256	0,72500	0,78788	1,00000				
103-T7	0,62376	0,73457	0,78488	0,69375	0,69697	0,72674	1,00000			
103-T8	0,65347	0,74691	0,76163	0,75000	0,78788	0,78488	0,79070	1,00000		
103-T9	0,76238	0,75926	0,69186	0,75000	0,79394	0,80814	0,72093	0,80233	1,00000	
103-T10	0,68317	0,72667	0,71250	0,76875	0,77124	0,74375	0,71250	0,78125	0,85625	1,00000

Hasil penelitian ini juga masih lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Ajabang *et al.* (2012) dengan rata-rata jumlah alel 4,71 dan nilai PIC 0,60.

Penelitian Ajabang *et al.* (2012) menggunakan aksesori kelapa sawit asal Kamerun akan tetapi individu tanaman yang diuji dipilih berdasarkan lokasi dari mana aksesori-aksesori dikoleksi di Kamerun. Persentase polimorfisme yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Zulhermana (2009) pada keragaman genetik kelapa sawit pisifera asal Nigeria, yaitu sebesar 68%. Nilai PIC dan jumlah alel per lokus sangat tergantung dari keragaman aksesori plasma nutfah yang diuji dan karakteristik marka SSR yang digunakan. Dengan demikian marka SSR yang digunakan pada penelitian ini mampu menangkap jumlah polimorfisme dan jumlah alel per

lokus yang lebih baik dibanding penelitian sebelumnya untuk analisis keragaman genetik materi genetik Indonesia maupun materi genetik sawit hasil introduksi dari sumber keragaman kelapa sawit. Dengan demikian 20 marka SSR hasil penelitian ini lebih sensitif dalam mendeteksi keragaman alel yang ada pada aksesori yang diuji sehingga kemungkinannya lebih bermanfaat digunakan untuk uji diversitas genetik kelapa sawit baik itu untuk membedakan individu dalam aksesori, antar aksesori, maupun antar species kelapa sawit.



Gambar 1. Dendrogram kekerabatan suatu aksesori (*intra accession phylogenetic analysis*) dari 10 individu tanaman anggota aksesori C103-T (tipe aksesori Tenera) hasil analisis menggunakan 20 marka SSR

Figure 1. Dendrogram of the *intra accession phylogenetic analysis* of ten individual plant members of accession 103-T (Tenera type oil palm accession) based on the analysis results of the 10 individual DNA using 20 SSR markers.

Uji filogenetik 16 aksesori kelapa sawit dianalisis berdasarkan 20 marka SSR menunjukkan keragaman (diversitas) aksesori berkisar antara 10-44% (tingkat kesamaan genetik 56 - 90%) (Tabel 5, Gambar 2). Dengan tingkat keragaman genetik 44 % membagi aksesori menjadi empat kelompok. Delapan aksesori *Eo* (*Eo1-Eo8*) mengelompok menjadi satu kelompok pada kelompok I dengan diversitas genetik diantara kedelapan aksesori berkisar antara 10-15% (tingkat kesamaan genetik 85-90%) (Gambar 2). Ini menunjukkan bahwa kedelapan aksesori *Eo* ini memang sangat berkerabat dekat dengan kesamaan pola pita 20 marka SSR dalam genomnya sebesar 85-90% yang menunjukkan bahwa aksesori-aksesori ini memang sangat dekat secara genetik. Hasil ini mengkonfirmasi bahwa kedelapan aksesori *Eo* ini memang hampir sama satu dengan yang lainnya. Persilangan antar aksesori ini akan menghasilkan keragaman progeni yang rendah dan tidak potensial sebagai tetua untuk program pemuliaan kelapa sawit.

Aksesori *Eo9*, bagaimanapun juga sangat berbeda dengan aksesori *Eo* lainnya (*Eo1- Eo8*) dan membentuk klaster sendiri pada kelompok III. Aksesori *Eo9* mempunyai diversitas genetik 44% dengan anggota aksesori *Eo* lainnya. Pada penelitian ini kita membandingkan aksesori dengan species yang sama *E. oleifera*. *Eo1-Eo8* adalah aksesori *Eo* yang memang berkerabat dekat. *Eo9*, dipihak lain memang secara genetik berkerabat jauh

dengan *Eo1-Eo8* dan kemungkinan juga beradaptasi di lingkungan yang jauh berbeda dengan *Eo1-Eo8*. *Eo9* ini sangat potensial sebagai tetua untuk disilangkan dengan salah satu anggota *Eo1-Eo8* dan berpotensi menghasilkan progeni superior.

Kelompok II adalah IND-6 yang berkerabat lebih dekat dengan *Eo1-Eo8* dengan kesamaan genetik 62% (diversitas genetik 38%). IND-6 terpisah jauh dengan aksesori IND lainnya. IND-6 mempunyai diversitas genetik 40% dengan aksesori IND1-5 dan IND-7. Ini bisa terjadi kemungkinan karena aksesori IND-6 adalah aksesori Indonesia yang pernah mengalami proses penambahan genom dengan latar belakang genom dari aksesori *Eo1-Eo8*. IND-6 kemungkinan besar mengandung DNA hasil introgresi dari aksesori *Eo*.

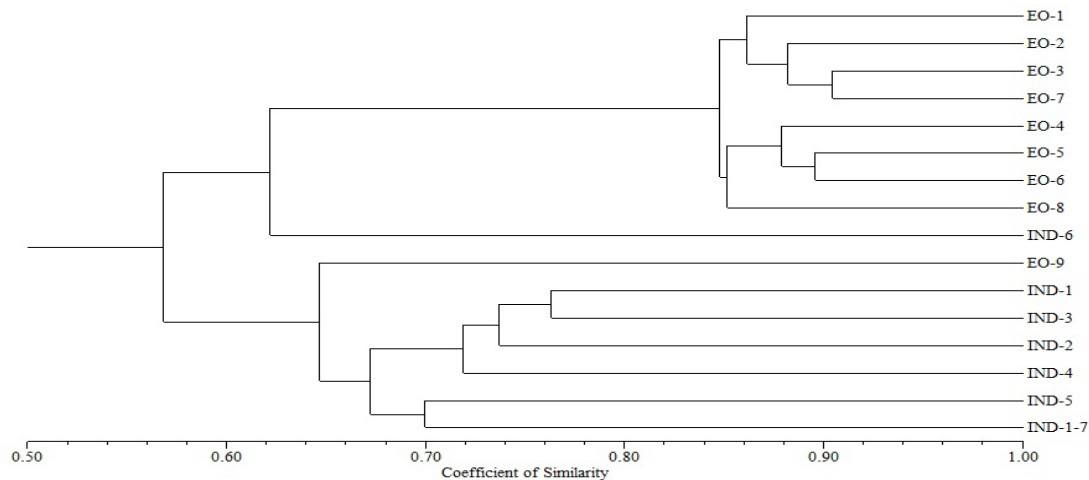
Kelompok IV adalah aksesori Indonesia yang umumnya merupakan tipe Tenera dan sebagian kecil tipe Dura yang telah beradaptasi baik di Indonesia baik sebagai varietas unggul maupun tetua dari varietas unggul. Kelompok IV ini mempunyai diversitas genetik 24-33% atau kesamaan genetik 67-76% (Gambar 2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum 20 marka SSR hasil penelitian ini dapat membedakan aksesori dari species kelapa sawit yang berbeda. Anggota aksesori species *Eo* mengelompok sendiri (*Eo1-Eo8*), dan anggota aksesori species *Eg* mengelompok sendiri IND1-5, IND7. IND-6 berada

Tabel 5. Profil 20 marka SSR yang diamplifikasi pada DNA 16 aksesori kelapa sawit (9 aksesori *E. oleifera* dan 7 aksesori sawit *E. guineensis* yang telah beradaptasi di Indonesia).

Table 5. The profiles of 20 SSR markers amplified on DNA of 16 oil palm accessions (9 accessions of *E. oleifera* and 7 accessions of the *E. guineensis*, Indonesian well- adapted oil palm accessions).

Marka SSR SSR marker	Jumlah Alel Allele number	Ukuran Alel (bp) Allele size	Nilai PIC ^a PIC value
LG 1 3782	5	275-290	0,70
LG 2 0800	4	200-230	0,69
LG 3 0882	7	132-170	0,81
LG 3 2347	9	153-177	0,83
LG 4 0059	7	170-195	0,81
LG 5 2813	8	200-242	0,83
LG 6 0195	8	235-300	0,81
LG 7 3287	7	275-321	0,79
LG 8 0555	8	224-270	0,80
LG 9 2188	8	140-175	0,83
LG 10 0445	4	230-275	0,74
LG 11 3755	10	244-295	0,83
LG 11 0878	10	170-200	0,84
LG 12 3672	15	158-194	0,89
LG 13 2569	8	245-290	0,81
LG 14 2427	9	123-152	0,86
LG 15 3534	12	130-250	0,87
LG 15 3402	14	197-285	0,89
LG 16 3298	7	122-145	0,85
LG 16 0782	12	130-240	0,82
Rata-rata (nilai kisaran) Average (range value)	8,45 (4-12)	-	0,81(0,69-0,89)

^aPIC = polymorphism information content.



Gambar 2. Dendrogram kekerabatan intra dan inter species kelapa sawit diuji menggunakan 20 marka SSR. Sembilan individu tanaman anggota aksesori *E. oleifera* asal Amerika Selatan (Eo1-Eo9) dan tujuh aksesori *E. guineensis* (Tenera) yang sudah beradaptasi di Indonesia (IND1-IND7) diuji diversitas genetiknya menggunakan 20 marka SSR terpilih.

Figure 2. Dendrogram of the intra-and inter-species phylogenetic analysis based on analysis results of the 16 individual accession DNA analyzed using 20 SSR markers. Nine accessions of *E. oleifera* originated from South America (Eo1-Eo9) and seven accessions of *E. guineensis* (Tenera type) of the well-adapted Indonesian genotypes (IND1-IND7) were analyzed using the selected 20 SSR markers.

lebih dekat dengan kelompok *Eo* karena IND-6 diduga mengandung lebih banyak genom *Eo*, sebaliknya *Eo9* berada lebih dekat dengan kelompok *Eg* karena aksesori *Eo9* diduga mengandung lebih banyak genom *Eg* dibanding genom *Eo* untuk sekuen 20 marka SSR terpilih yang digunakan pada penelitian ini. Dengan demikian, 20 marka SSR yang diuji pada penelitian ini telah dapat dengan jelas membedakan individu dalam aksesori, individu antar aksesori, dan individu antar species kelapa sawit.

Hasil penelitian ini bermanfaat untuk menangani koleksi plasma nutfah kelapa sawit di lapang dan sebagai pedoman dalam pemilihan calon tetua untuk pemuliaan kelapa sawit. Uji diversitas genetik dan uji kekerabatan koleksi aksesori kelapa sawit dapat dilakukan dengan cepat dan akurat menggunakan marka SSR. Data kekerabatan yang didasarkan pada marka DNA, peneliti plasma nutfah kelapa sawit dapat menentukan kekerabatan antar aksesori kelapa sawit dan mengoleksi hanya aksesori yang berbeda secara genetik. Uji kekerabatan menghindari duplikasi koleksi di lapang, sehingga koleksi plasma nutfah menjadi lebih efisien, efektif, dan berdaya guna untuk mendukung program pemuliaan kelapa sawit. Data hasil analisis kekerabatan antar aksesori akan memfasilitasi pemilihan calon tetua untuk mendukung program pemuliaan. Tetua dengan kekerabatan jauh yang potensial menghasilkan progeni dengan keragaan superior (memberi efek heterosis) sebagai kandidat varietas unggul baru kelapa sawit.

KESIMPULAN

1. Skrining 39 marka SSR pada empat aksesori kelapa sawit asal Kamerun menghasilkan 20 marka SSR terpilih dengan polimorfisme tinggi, pola pita jelas, dan letaknya menyebar pada genom kelapa sawit.
2. Marka SSR terpilih dapat menganalisis diversitas genetik individu tanaman dalam aksesori (*intra accession*) dan individu antar aksesori (*inter accession*) kelapa sawit.
3. Marka SSR terpilih juga dapat memisahkan anggota aksesori dari species *E. guineensis* dan aksesori dari species *E. oleifera*, yaitu anggota aksesori dari setiap species mengelompok pada kelompok species masing-masing.
4. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa marka SSR terpilih dapat menganalisis diversitas genetik dengan jelas individu-individu dalam satu aksesori (*intra accession*), individu antar aksesori (*inter accession*), dan individu antar species (*inter species*) kelapa sawit.
5. Implikasi hasil penelitian ini untuk mendukung penanganan plasma nutfah kelapa sawit di lapang yang lebih efisien, efektif, berdaya guna dan memfasilitasi pemilihan calon tetua untuk program pemuliaan kelapa sawit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sekar Arumsari yang telah terlibat dalam penelitian ini dan PPKS Medan yang telah menyediakan sampel daun aksesi *E. oleifera* yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajabang, W., Sudarsono, D. Asmono D, and 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. *African Journal of Biotechnology* 11 (69): 13244-13249.
- Asmono, D., A.R. Purba, Y. Yenni, M. Kobar, H. Zaelani, T. Liwang, dan A.B. Beng. 2005. Peta dan prospek pemuliaan dalam industri pembenihan kelapa sawit di Indonesia. *Simposium Nasional dan Kongres V PERIPI*. Puwokerto: Perhimpunan Ilmu Permuliaan Indonesia.
- Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brotteir, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herran, H. Asmady, and C. Billot. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.* 110: 754-765. 9.
- Billotte, N., M.F. Jourjon, N. Marseillac, A. Berger, A. Flori, H. Asmady, B. Adon, R. Singh, B. Nouy, and F. Potier. 2010. QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theor. Appl. Genet.* 120: 1673-1687.
- Choo, Y.M., and B. Yusof. 1996. *Elaeis oleifera* palm for the pharmaceutical industry. *PORIM Inf. Ser.* 42: 1-4.
- Feng, S.P., Li WG, H.S. Huang, J.Y. Wang, and Y.T. Wu. 2009. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol. Breed.* 28: 85-97.
- Hairinsyah. 2010. Pendugaan parameter genetik dan analisa keragaman genetik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dengan marka simple sequence repeat (SSR) [skripsi]. Bogor: Sekolah Pasca-sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Hayati, A., R. Wickneswari, I. Maizura, N. Rajanaidu. 2004. Genetic diversity of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) germplasm collections from Africa: Implications for improvement and conservation of genetic resources. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1274-1284.
- Johansen, M., H. Ellegren, and L. Anderson. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Heredity* 83: 196-198.
- Julianisah, I.N., L. Sulistyowati and N.A. Sugiharto. 2008. Analisis kekerabatan Mentimun (*Ucumis sativus* L) menggunakan metode RAPD-PCR dan Isozim. *Biodiversitas* 9 : 99-102.
- Luyindula, N., N. Mantantu, F. Dumortier, and R.H.V. Corley. 2005. Effects of inbreeding on growth and yield of oil palm. *Euphytica* 143: 9-17.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Xu Y, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, Fu B, R. Maghirang, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, M. Yano, R. Fjellstrom, G. Declerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and I. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 257-279.
- Michiels, A.N., Van Den EW, M. Tucker, R. Liesbet, and L. Van Andre. 2003. Extraction of high quality genomic DNA from latex containing plants. *Analytical Biochemistry* 315 : 85-89.
- Pamin, K. 1998. A hundred and fifty years of oil palm development in Indonesia: from the Bogor Botanical Garden to the industry. *International Proceeding Oil Palm Conference*. Bali: IOPRI.
- Putri, L.A.P., Sudarsono, D. Asmono, N. Billote. 2011. Pendugaan keragaman genetik kelapa sawit tipe Dura berdasarkan marka mikrosatelit. *Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara*, Medan 22 Januari 2011.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Applied Biostatistics Inc.
- Rohrer, G.A., L.J. Alexander, J.W. Keele, T.P. Smith, and Beattie CW. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136: 231-245.
- Sambrook, J., E.F. Fritch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satyawan, D., and I.M. Tasma. 2011. DNA markers applicable for genetic mapping of *J. curcas* genome. *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri* 2 (3): 411-419.
- Simmonds, N.W. 1993. Introgression and incorporation: strategies for the use of crop genetic resources. *Biological Review*, New York, v. 68, p. 539-562, 1993.
- Singh, R., M.Z. Noorhariza, N.C. Ting, R. Rozana, S.G. Tan, L.E.T. Low, M. Ithnin, and S.C. Cheah. 2008. Exploiting an oil palm EST the development of gene-derived and their exploitation for assessment of genetic diversity. *Biologia* 63: 1-9.

- Smith, J.S.C., E.C.L. Chin, H. Shu, O.S. Smith, S.J. Wall, M.L. Senior, S.E. Mitchell, S. Kresovich, and J. Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical Applied Genetics* 95: 163-173.
- Tasma, I.M., L.L. Lorenzen, D.E. Green, and R.C. Shoemaker. 2001. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. *Molecular Breeding* 8: 25-35.
- Tasma, I.M., D. Satyawati, A. Warsun, M. Yunus, and B. Santosa. 2011. Phylogenetic and maturity analysis of sixty soybean genotypes used for DNA marker development of early maturity quantitative trait loci in soybean. *J. Agro Biogen* 7(1): 37-46.
- Tasma, IM, Warsun A, Satyawati D, Syafaruddin, and Martono B. 2013. Analisis kekerabatan 50 aksesori kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) asal Kamerun berdasarkan marka mikrosatelit. *Jurnal Agro Biogen* 9(1): 19-27.
- Ting, N.C., M.Z. Noorhariza, R. Rozana, L.E.T. Low, M. Ithnin, S.C. Cheah, S.G. Tan, R. Singh. 2010. SSR mining in oil palm EST database: Application in oil palm germplasm diversity studies. *J. Genet.* 89: 135-145.
- Zaki, N.M., R. Singh, R. Rosli, and I. Ismail. 2012. *Elaeis oleifera* Genomic-SSR Markers: Exploitation in Oil Palm Germplasm Diversity and Cross Amplification in Arecaceae. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 4069-4088.
- Zulhermana. 2009. Keragaman genetik intra dan interpopulasi kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pisifera asal Nigeria berdasarkan analisis marka simple sequence repeat (SSR) [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor