

Depresi Silangdalam Kelapa Dalam Mapanget Berdasarkan Penanda Mikrosatelit (SSR)

DONATA S. PANDIN

Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain, Manado
Jalan Raya Mapanget, Kotak Pos 1004 Manado-95001

Diterima 8 Juni 2009 / Direvisi 24 Agustus 2009 / Disetujui 9 November 2009

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui depresi silangdalam berdasarkan penanda molekular (SSR) pada tanaman kelapa Dalam Mapanget No. 32 (DMT-32), akibat penyerbukan sendiri pada generasi S2, S3, dan S4. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Tumbuhan, Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Pelaksanaan penelitian dilaksanakan mulai Mei 2004 sampai dengan Mei 2007. Analisis molekular menggunakan penanda mikrosatelit (SSR). Berdasarkan penanda molekular menggunakan 15 lokus mikrosatelit (SSR) dari 19 lokus yang diuji, ditemukan bahwa depresi silangdalam terekspreasi pada kelapa DMT-32 hasil penyerbukan sendiri. Depresi silangdalam pada DMT-32 S2 (2.78%), DMT-32 S3 (10.54%), dan DMT-32 S4 (15.74%). Hasil ini didukung oleh pengamatan terhadap produksi buah per pohon per tahun pada populasi DMT-32 S4 yang sampai dengan umur 11 tahun belum berbuah. Empat dari 15 lokus mikrosatelit yang digunakan tidak lagi berada pada kesetimbangan Hardy-Weinberg artinya lokus-lokus tersebut pada populasi generasi S4 telah hampir homogen bergenotipe homozigot sehingga alel-alel dari lokus tersebut tidak lagi diwariskan secara bebas ke generasi berikutnya. Kelapa DMT-32 S4 telah dapat digunakan sebagai materi persilangan untuk mendapatkan turunan dengan tingkat heterosis tinggi.

Kata kunci: Kelapa Dalam, Cocos nucifera L, depresi silangdalam, mikrosatelit (SSR)

ABSTRACT

Inbreeding Depression Analysis Based on Microsatellite (SSRs) Markers in Mapanget Tall Coconut

The objective of this research was to determine inbreeding depression based on microsatellite (SSR) markers of second, third, and fourth generations of selfed Mapanget Tall coconut No.32 (DMT-32). The research was conducted in Plant Biology Laboratory, Research Center of Plant Genetic Resources and Biotechnology, Institut Pertanian Bogor. The research was done since May 2004 until May 2007. Fifteen out of 19 microsatellite (*Simple Sequence Repeats*, SSR) loci (primers) were used to analyze inbreeding depression in each generation of selfed Mapanget Tall coconut No.32. Based on 15 loci of microsatellite (SSRs) markers, showed that inbreeding depression expressed and have tendency to increase from generation to next generation of selfed Mapanget Tall coconut No.32 (DMT-32). Inbreeding depression in DMT-32 S2 (2.78%), DMT-32 S3 (10.54%), and DMT-32 S4 (15.74%). Four out of 15 microsatellite loci used were not in Hardy-Weinberg equilibrium, means that in DMT-32 S4 those loci were homozygote that's why alleles of those loci were not inherits in equilibrium. DMT-32 S4 coconut can be used as plant materials to find progeny with higher heterosis level.

Keywords: Tall coconut, Cocos nucifera L, inbreeding depression, Microsatellite (SSR).

PENDAHULUAN

Depresi silangdalam adalah suatu kejadian turunnya kekekanan (vigor) akibat meningkatnya derajat homozigositas pada tanaman menyerbuk terbuka, yang keturunannya dihasilkan dari proses penyerbukan sendiri.

Depresi silangdalam dan heterosis adalah dua fenomena bertolak belakang yang banyak dipelajari pada tanaman dan binatang. Depresi silangdalam berkaitan dengan menurunnya kekekanan turunan hasil penyerbukan sendiri (Stebbins, 1958), sebaliknya heterosis berkaitan dengan keunggulan hibrida (F1) melebihi nilai atau rata-rata kedua tetuanya.

Kelapa Dalam Mapanget (DMT) yang memiliki jumlah buah banyak, kadar kopra dan kadar minyak tinggi diseleksi dan beberapa nomor pohon terpilih disilangkan. Persilangan nomor-nomor terpilih tersebut dihasilkan kelapa Dalam unggul yang diberi nama Kelapa Baru (KB), yaitu KB-1 (32 x 32), KB-2 (32 x 2), KB-3 (32 x 83) dan KB-4 (32 x 99) dengan potensi produksi 3 - 3.5 ton kopra per hektar per tahun (Novarianto, 1996).

Penyerbukan sendiri kelapa Dalam Mapanget (DMT) telah dilakukan hingga mencapai generasi keempat (S4). Kelapa DMT yang tersisa 29 nomor hasil seleksi massa negatif diseleksi lagi berdasarkan jumlah buah dan jumlah tandan dan didapatkan beberapa nomor terseleksi. Beberapa nomor terpilih yang berproduksi tinggi di antaranya adalah No. 2, No. 10, No. 32, No. 55, No. 83, dan No. 99. Kelapa DMT No. 10, No. 32, dan No. 55 dibuat menyerbuk sendiri dan turunannya ditanam di Kebun Percobaan Mapanget pada tahun 1957 membentuk

populasi DMT (S1). Populasi S1 ini diseleksi lagi dan individu terseleksi dibuat menyerbuk sendiri dan keturunan yang diperoleh ditanam di Kebun Percobaan Kima Atas pada tahun 1967, yang membentuk populasi DMT (DMT S2). Dengan cara yang sama didapatkan populasi DMT generasi ketiga (DMT S3) pada tahun 1979, dan generasi keempat (DMT S4) pada tahun 1995.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui besarnya depresi silangdalam yang terjadi berdasarkan penanda DNA mikrosatelit (SSR) pada kelapa Dalam Mapanget No. 32 akibat penyerbukan sendiri selama empat generasi yaitu pada generasi S2, S3, dan S4 (DMT-32 S2, DMT-32 S3, DMT-32 S4).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Tumbuhan, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Pelaksanaan penelitian mulai dari Mei 2004 sampai dengan Mei 2007. Untuk analisis molekular digunakan daun muda dari populasi kelapa DMT-32 (S2) sebanyak 9 pohon, DMT-32 (S3) sebanyak 40 pohon, dan DMT-32 (S4) sebanyak 38 pohon. Bahan tanaman berasal dari koleksi Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain di Kima Atas, Sulawesi Utara.

DNA total tanaman diisolasi mengikuti metode Rohde *et al.* (1995) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 1.5 gram daun kelapa yang masih muda dimasukkan kedalam mortar yang berisi 10 ml buffer lisis (100 mM Tris-HCl pH8, 2% (m/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, dan 0.2% β -mercaptoetanol (ditambahkan pada saat akan diisolasi) dan 0.07 g pasir kuarsa, digerus sampai halus. Serbuk daun dipindahkan ke dalam

tabung 15 ml dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1.5 jam. Suspensi DNA dipanen dengan melakukan sentrifus pada 4000 rpm selama 5 menit. Supernatan diberi 1 volume kloroform : isoamil alkohol (24:1), dikocok perlahan sampai homogen lalu disentrifus pada 4000 rpm selama 10 menit. Suspensi DNA dipresipitasi dengan menambahkan 0.1 volume sodium asetat 3 M pH 8, dan 0.8 volume isopropanol. Endapan DNA didapat melalui sentrifus pada 4000 rpm selama 10 menit, lalu disuspensi dalam 500 µl larutan TE 1X. Untuk menghilangkan kontaminan RNA, kedalam suspensi DNA ditambahkan RNase A dengan konsentrasi 20 ug/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya suspensi DNA diekstraksi berturut-turut dengan 1 volume fenol, dan campuran kloroform : isoamil alkohol (24 : 1). Suspensi DNA dipresipitasi dengan 0.8 volume isopropanol lalu dibilas dengan alkohol 70% dingin. Pelet DNA kering diberi 200 µl TE dan disimpan pada 20°C.

Penetapan kuantitas dan kemurnian DNA diukur menggunakan spektrofotometer (Cecil CE 2020) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA mempunyai kemurnian tinggi jika ratio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm berkisar antara 1.8 – 2.0 (Sambrook *et al.*, 1989). Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan rumus : pengenceran x nilai absorbansi pada 260 nm x 50 ug / ml.

Kualitas DNA diketahui dengan membandingkan hasil migrasi DNA total bersama DNA standar ?/HindIII pada gel agarose menggunakan elektroforesis horizontal. DNA yang berkualitas baik adalah fragmen DNA dengan ukuran besar.

Analisis Mikrosatelit (*Simple Sequence Repeat/SSR*) menggunakan pasangan

primer yang telah memberikan polimorfik yang jelas pada tanaman kelapa yaitu yang dikembangkan oleh CIRAD (2002) sebanyak 14 primer (Tabel 1), dan 5 primer oleh Rivera *et al.*, 1999 (Tabel 2). Reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang digunakan dengan total volume 25 µl adalah 1 x buffer PCR (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 200 µM dNTP, 20 pmol *forward primer* dan 20 pmol *reverse primer*, 1 U Taq polymerase (AmpliTag Promega), dan 10 ng DNA dengan volume akhir reaksi 25 µl. Reaksi amplifikasi DNA berlangsung sebanyak 35 siklus pada mesin PCR (*Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer*). Program PCR yang digunakan adalah 94°C selama 5 menit untuk pre PCR, 94°C 40 detik untuk denaturasi, 52°C – 54°C selama 1 menit untuk pelekatan primer (*annealing*), 72°C selama 1 menit pemanjangan primer (*extension*), dan 72°C selama 7 menit untuk post PCR. Pita produk amplifikasi dipisahkan menggunakan gel polyacrylamide 6% dalam 1 x buffer TBE dan divisualisasikan menggunakan pewarnaan perak (*silver staining*) mengikuti metode Creste *et al.* (2001) dengan sedikit modifikasi.

Setiap produk PCR dicampur dengan 3 x STR *loading dye* (98% formamide yang mengandung 10 mM EDTA, 0.01% [w/v] *Xylene cyanol*, dan 0.01% [w/v] *Bromophenol Blue*). Gel PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) menggunakan buffer 1 x TBE dipanaskan hingga suhu 50°C-55°C. Produk PCR yang telah dicampur dengan STR *loading dye* *didenaturasi* pada 94°C selama 5 menit dan segera diisikan pada setiap baris PAGE sebanyak 3.5 µl. Selama proses elektroforesis kuat arus dipertahankan tetap konstan 75 W dan suhu ±50°C selama 60 – 90 menit bergantung

primer yang digunakan. PAGE mengandung 6% Polyacrylamide/Bisacrylamide perbandingan 19 : 1, 7 M Urea, dan 1 x TBE (90 mM Trisborate, 2mM EDTA).

Setelah proses elektroforesis menggunakan elektroforesis vertikal, di-

lanjutkan dengan pewarnaan gel PAGE dengan *silver staining* mengikuti metode Creste *et al.* (2001) dengan sedikit modifikasi.

Tabel 1. Nama 19 primer SSR yang digunakan dan urutan basa nukleotidnya.
Table 1. Name and nucleotide sequence of 19 SSR primers used.

No	Primer/Primers	Urutan basa Base sequence
1	CnCir A3	Forward (5'–3') AATCTAAATCTACGAAAGCA Reverse (5'–3') AATAATGTGAAAAAGCAAAG
2	CnCir A9	Forward (5'–3') AATGTTTGTGCTTTGTGCGTGTGT Reverse (5'–3') TCCTAATTTTTCTTCCCTTCCTCA
3	CnCirC3'	Forward (5'–3') AGAAAGCTGAGAGGGAGGATT Reverse (5'–3') GTGGGGCATGAAAAGTAAC
4	CnCirC7	Forward (5'–3') ATAGCATATGGTTTCCT Reverse (5'–3') TGCTCCAGCGTTCATCTA
5	CnCir E2	Forward (5'–3') TCGCTGATGAATGCTTGCT Reverse (5'–3') GGGGCTGAGGGATAAACC
6	CnCirE10	Forward (5'–3') TTGGGTTCCATTTCTTCTCTCATC Reverse (5'–3') GCTCTTAGGGTTGCTTTCTTAG
7	CnCirE12	Forward (5'–3') TCACGCAAAAGATAAAACC Reverse (5'–3') ATGGAGATGGAAAGAAAGG
8	CnCir F2	Forward (5'–3') GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA Reverse (5'–3') CGACGACCCAAAACCTGAACAC
9	CnCirH4'	Forward (5'–3') TTAGATCTCCTCCCAAAG Reverse (5'–3') ATCGAAAGAACAGTCACG
10	CnCir H7	Forward (5'–3') GAGATGGCATAACACCTA Reverse (5'–3') TGCTGAAGCAAAAGAGTA
11	CnCir F2	Forward (5'–3') GGTCTCCTCTCCCTCCTTATCTA Reverse (5'–3') CGACGACCCAAAACCTGAACAC
12	CnCirG11	Forward (5'–3') AATATCTCCAAAATCATCGAAAG Reverse (5'–3') TCATCCACACCCTCCTCT
13	CnCirH4'	Forward (5'–3') TTAGATCTCCTCCCAAAG Reverse (5'–3') ATCGAAAGAACAGTCACG
14	CnCir H7	Forward (5'–3') GAGATGGCATAACACCTA Reverse (5'–3') TGCTGAAGCAAAAGAGTA
15	CNZ 05	Forward (5'–3') CTTATCCAAATCGTCACAGAG Reverse (5'–3') AGGAGAAGCCAGGAAAGATTT
16	CNZ 09	Forward (5'–3') ATCTACCAGTGTGGTCTCTC Reverse (5'–3') ACCAGGAAAAAGAGCGGAGAA
17	CNZ 18	Forward (5'–3') ATGGTTCAGCCCTTAATAAAC Reverse (5'–3') GAACTTTGAAGCTCCCATCAT
18	CNZ 21	Forward (5'–3') ATGTTTGTAGCTTCACCATGAA Reverse (5'–3') TCAAGTTCAAGAAGACCTTTG
19	CNZ 51	Forward (5'–3') CTTTAGGGAAAAAGGACTGAG Reverse (5'–3') ATCCATGAGCTGAGCTTGAAC

Sumber/Source: CIRAD (2002); Rivera *et al.* (1999)

Tabel 2. Jumlah alel, frekuensi heterozigot, Indeks fiksasi dan depresi silangdalam DMT- 32 S2, DMT-32 S3 dan DMT-32 S4 berdasarkan penanda SSR.

Table 2. Number of allele, heterozygosity frequency, fixation index, and inbreeding depression of DMT-32 S2, DMT-32 S3, and DMT-32 S4 based on SSR markers.

Lokus Loci	Alel Allele	Heterozigot harapan (H_E) Expected heterozygosity	Heterozigot aktual (H_o) Observed heterozygosity		
			S2	S3	S4
CNZ 05	4	0.71	0.57	0.73	0.50
CNZ 09	3	0.88	0.67	0.70	0.61
CNZ 18	6	0.96	0.89	0.85	0.76
CNZ 21	3	0.86	0.88	0.68	0.63
CNZ 51	3	0.76	0.78	0.43	0.58
CnCirA3	3	0.68	0.56	0.75	0.63
CnCirA9	4	0.79	0.56	0.50	0.61
CnCirC3'	4	0.84	0.79	0.58	0.58
CnCirC7	3	0.66	0.56	0.53	0.45
CnCir E2	4	0.70	0.78	0.65	0.55
CnCirE10	5	0.73	0.89	0.83	0.82
CnCirE12	5	0.76	0.89	0.85	0.63
CnCir F2	5	0.76	0.89	0.85	0.84
CnCirH4'	4	0.73	0.78	0.70	0.74
CnCirH7	4	0.74	0.78	0.78	0.82
Rataan	4	0.77	0.75	0.69	0.65
Indeks Fiksasi/Fixation index		-	0.07	0.05	0.04
Depresi silangdalam/Inbreeding depression		-	0.03	0.12	0.16

Besarnya depresi silangdalam dihitung menggunakan rumus (Hartl, 1988):

$$F = \frac{H_E - H_o}{H_E}$$

F = koefisien silangdalam,
 H_E = heterozigot harapan,
 H_o = heterozigot observasi

Rata-rata heterozigot observasi, H_o , yang merupakan rata-rata proporsi dari genotipe heterozigot aktual untuk masing-masing lokus pada setiap generasi menyerbuk sendiri dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$H_o = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{N A_i}{N}}{k}$$

$N A_i$ = jumlah genotipe heterozigot,
 N = total semua genotipe,
 k = jumlah populasi.

Rata-rata heterozigot harapan, H_E , yang merupakan rata-rata proporsi dari genotipe heterozigot harapan untuk masing-masing lokus untuk semua populasi, dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$H_E = \frac{\sum_{i=1}^k 2 p_i q_i}{k}$$

$p_i q_i$ = alel-alel komplemen
 k = banyaknya populasi

Untuk memudahkan penghitungan digunakan Program Komputer POPGENE ver. 1.32 (Yeah *et al.*, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Depresi silangdalam secara tidak langsung dapat dilihat pada tingkat heterozigositas dalam populasi. Smouse

(1986) menyatakan depresi silang dalam direpresentasikan oleh koefisien *inbreeding* atau indeks fiksasi yang merupakan ukuran turun atau naiknya heterozigositas dalam suatu populasi. Indeks fiksasi positif mengindikasikan berkurangnya genotipe heterozigot, sedangkan indeks fiksasi negative menunjukkan peningkatan genotipe heterozigot.

Dari 19 lokus SSR yang digunakan dalam penelitian ini 15 lokus dapat menghasilkan pita-pita polimorfis dengan jumlah alel antara 3 sampai 6 atau rata-rata 4 alel per lokus.

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata heterozigot aktual dari kelapa DMT-32 S2, DMT-32 S3 dan DMT-32 S4 lebih kecil dari nilai heterozigot harapan. Hal ini berarti bahwa pada setiap generasi hasil penyerbukan sendiri cenderung mengalami defisit heterozigositas, sehingga struktur genotipe akan mengarah ke peningkatan homozigositas untuk lokus-lokus yang digunakan.

Heterozigositas adalah karakteristik yang paling penting dari suatu lokus. Heterozigositas suatu lokus menentukan suatu individu bersifat heterozigot untuk lokus tertentu dalam suatu populasi. Untuk penanda molekular, suatu lokus dengan heterozigositas lebih dari 70% menunjukkan penanda tersebut memiliki polimorfisme tinggi (Ott, 1992).

Depresi silang dalam ditemukan pada populasi kelapa DMT-32 S2, DMT-32 S3 dan DMT-32 S4 menggunakan penanda mikrosatelit, masing-masing sebesar 2.78%, 10.54%, dan 15.74%. Hasil ini memperlihatkan bahwa telah terjadi depresi silang dalam yang semakin meningkat pada setiap generasi hasil penyerbukan sendiri. Nilai depresi silang dalam menggunakan 15 lokus SSR dalam penelitian ini lebih rendah jika

dibandingkan dengan yang diperoleh Akuba (2002) pada populasi kelapa DMT S3 dan DMT S4 masing-masing 94.08% dan 97.66%. Perbedaan dapat terjadi karena populasi yang digunakan Akuba merupakan populasi campuran dari beberapa nomor. DMT menyerbuk sendiri, sedangkan yang digunakan dalam penelitian ini hanya merupakan turunan dari DMT No. 32. Selain itu jenis dan jumlah lokus SSR yang digunakan juga berbeda. Nilai depresi silang dalam berdasarkan penanda SSR ini nilainya semakin besar pada populasi penyerbukan sendiri generasi berikutnya, artinya beberapa lokus yang digunakan dalam penelitian ini tingkat homozigositasnya telah meningkat.

Adanya depresi silang dalam pada tanaman yang bersifat menyerbuk terbuka seperti kelapa dapat dijelaskan melalui dua hipotesis, yaitu hipotesis overdominan dan hipotesis dominan. Hipotesis overdominan menerangkan bahwa depresi silang dalam adalah akibat dari peningkatan homozigositas pada karakter yang lebih menguntungkan dalam genotipe heterozigot. Hipotesis dominan menerangkan bahwa peningkatan homozigositas mengakibatkan peluang bertemunya alel-alel resesif yang merugikan menjadi lebih tinggi (Falconer dan Mackay, 1996). Alel-alel merugikan ini berpengaruh pada kekekan tanaman secara umum. Alel-alel resesif yang merugikan dan bukan alel overdominan adalah faktor utama penyebab depresi silang dalam (Crow dalam Ritland, 1996). Berdasarkan hipotesis dominan, terjadinya depresi silang dalam pada populasi tanaman kelapa tipe Dalam dapat mengindikasikan adanya aksi gen dominan. Filho (1997) menyatakan bahwa depresi silang dalam terjadi hanya karena efek dominan, artinya

pada karakter yang tidak ada dominansi tidak akan terdeteksi adanya depresi silangdalam.

Dalam upaya merakit kelapa yang unggul diperlukan tetua-tetua homozigot. Persilangan antar dua tetua homozigot yang berbeda akan menghasilkan zuriat yang unggul akibat pengaruh heterosis (Allard, 1960). Kelapa tipe Dalam pada umumnya menyerbuk silang sehingga zuriatnya memiliki penampilan beragam karena genotipe yang heterozigot (Menon dan Pandalai 1960; Child 1974; Fremond *et al.*, 1966; Foale, 1992). Untuk mendapatkan tetua homozigot pada kelapa Dalam dapat

diperoleh melalui teknik penyerbukan sendiri sampai beberapa generasi. Zuriat yang dihasilkan dari proses penyerbukan sendiri akan memiliki derajat homozigot yang meningkat dengan penurunan vigor sebagai akibat adanya peristiwa depresi silangdalam. Kelapa Dalam Mapanget No. 32 yang diseleksi berdasarkan jumlah buah dan jumlah tandan lalu dilakukan penyerbukan sendiri, ditemukan depresi silangdalam terekspresi pada kedua karakter tersebut. Menurunnya vigoritas terlihat pada produksi buah dan tandan yang semakin berkurang pada setiap generasi penyerbukan sendiri (Tabel 3 dan 4).

Tabel 3. Produksi buah per pohon per tahun pada setiap generasi menyerbuk sendiri kelapa DMT-32.

Table 3. Fruit production per tree per year in each generation of selfed DMT 32 of coconut.

Produksi buah per pohon per tahun Fruit production per tree per year									
S2		S3				S4			
No.	? buah fruit	No.	? buah fruit	No.	? buah fruit	No.	? buah fruit	No.	? buah fruit
1	156	1	120	21	98	1	0	21	36
2	105	2	60	22	108	2	24	22	0
3	117	3	134	23	96	3	27	23	0
4	165	4	84	24	55	4	48	24	55
5	104	5	105	25	66	5	48	25	0
6	135	6	118	26	96	6	12	26	0
7	156	7	135	27	61	7	0	27	8
8	136	8	98	28	114	8	0	28	10
9	119	9	56	29	64	9	0	29	0
-	-	10	112	30	65	10	20	30	0
-	-	11	98	31	70	11	0	31	0
-	-	12	120	32	104	12	0	32	0
-	-	13	105	33	90	13	35	33	36
-	-	14	128	34	84	14	44	34	12
-	-	15	63	35	97	15	14	35	0
-	-	16	66	36	105	16	0	36	105
-	-	17	112	37	78	17	60	37	16
-	-	18	122	38	48	18	33	38	18
-	-	19	55	39	62	19	40	39	-
-	-	20	55	40	69	20	18	40	-

Tabel 4. Jumlah tandan per pohon per tahun pada setiap generasi menyerbuk sendiri kelapa DMT-32.

Table 4. Bunch number per tree per year in each generation of selfed DMT- 32 coconut.

Produksi tandan per pohon per tahun Bunch production per tree per year									
S2		S3				S4			
No.	? tandan Bunch	No.	? tandan Bunch	No.	? tandan Bunch	No.	? tandan Bunch	No.	? tandan Bunch
1	13	1	15	21	11	1	0	21	8
2	15	2	15	22	12	2	8	22	0
3	13	3	15	23	11	3	9	23	5
4	14	4	14	24	11	4	11	24	11
5	13	5	15	25	12	5	12	25	8
6	15	6	16	26	9	6	6	26	6
7	13	7	15	27	13	7	0	27	8
8	17	8	14	28	14	8	0	28	5
9	17	9	14	29	13	9	0	29	0
-	-	10	16	30	14	10	10	30	0
-	-	11	14	31	15	11	0	31	0
-	-	12	15	32	15	12	0	32	0
-	-	13	15	33	14	13	11	33	9
-	-	14	16	34	14	14	10	34	4
-	-	15	9	35	15	15	7	35	4
-	-	16	11	36	13	16	6	36	15
-	-	17	14	37	12	17	12	37	8
-	-	18	12	38	12	18	11	38	9
-	-	19	11	39	13	19	10	39	-
-	-	20	11	40	11	20	9	40	-

Tabel 3 dan Tabel 4 memperlihatkan bahwa pada DMT-32 generasi S2, S3 dan S4 telah mengalami penurunan produksi buah dan tandan yang cukup besar. Pada Tabel 3, dapat dilihat DMT-32 S2 semua pohon masih termasuk kategori berbuah banyak dengan jumlah buah per pohon per tahun >100 butir. Pada DMT-32 S3, pohon yang berbuah >80% (kategori pohon berbuah banyak) sebanyak 60% dan 40% sisanya berbuah <70 butir. Pada DMT-32 S4, pohon yang termasuk dalam kategori berbuah banyak hanya 1 pohon atau setara dengan 2,5%, dan sisanya berbuah = 60 butir/pohon/tahun bahkan 16 pohon diantaranya tidak/belum berbuah sampai umur 11 tahun.

Tabel 4 memperlihatkan bahwa pada DMT-32 S2 produksi tandan berkisar antara 13-17 per pohon per tahun atau rata-rata 14,4 tandan. Pada DMT-32 S3 produksi tandan per pohon per tahun berkisar 9-16 tandan atau rata-rata 13,3 tandan dan pada DMT-32 S4 produksi tandan berkisar 0-15 tandan atau rata-rata 6,1 tandan. Pada DMT-32 juga terlihat bahwa sebanyak 11 pohon yang tidak menghasilkan tandan sampai tanaman berumur 11 tahun.

Menurunnya produksi buah dan tandan pada generasi hasil penyerbukan sendiri sejalan dengan hasil penelitian menggunakan mikrosatelit DNA pada Tabel 2. Tabel 2 memperlihatkan menurunnya homosigositas pada setiap

generasi hasil penyerbukan sendiri (DMT-32 S2 = 26%, DMT-32 S3 = 51%, dan DMT-32 S4 = 59%) dari kelapa DMT-32 yang mengakibatkan penurunan kekekaran tanaman.

Depresi silangdalam dan heterosis adalah dua fenomena bertolak belakang yang banyak dipelajari pada tanaman dan binatang. Depresi silangdalam berkaitan dengan menurunnya kekekaran turunan hasil penyerbukan sendiri pada keturunan yang bersifat menyerbuk terbuka, sebaliknya heterosis berkaitan dengan keunggulan hibrida (F1) melebihi nilai atau rata-rata kedua tetuanya (Stebbins, 1958).

Hasil penyerbukan pohon-pohon terpilih menggunakan populasi DMT-32 sampai generasi keempat, mengakibatkan

kan aliran gen tidak berlangsung secara bebas. Akibatnya beberapa lokus SSR yang digunakan tidak dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg (HW) disajikan pada Tabel 5.

Dari Tabel 5 dapat dilihat ada empat lokus yang mengalami perubahan frekuensi gen yang besar sehingga lokus SSR CNZ05, CnCirA9, CnCirC7, dan CnCirE2 tidak pada kesetimbangan Hardy-Weinberg. Kejadian ini menunjukkan bahwa akibat seleksi yang dilakukan berdasarkan karakter jumlah buah per tandan dan jumlah tandan per pohon per tahun lalu diikuti dengan persilangan di antara pohon-pohon yang berkerabat dekat, telah mengakibatkan beberapa lokus tidak lagi diwariskan secara bebas dari generasi ke generasi.

Tabel 5. Jumlah alel, individu heterozigot, individu homozigot, tingkat polimorfisme dan kesetimbangan Hardy-Weinberg

Table 5. Allel number, heterozygote individu, homozygote individu, polymorphism and Hardy-Weinberg equilibrium.

Lokus Loci	Alel Allele	Individu Individual	Heterozigot Heterozygote	Homozigot Homozygote	TP Polymorphism	HW
CNZ 05	4	87	42	45	0.46	**
CNZ 09	3	87	59	28	0.57	NS
CNZ 18	6	87	61	26	0.72	NS
CNZ 21	3	87	42	45	0.65	NS
CNZ 51	3	87	47	40	0.62	NS
CnCirA3	3	87	59	28	0.59	NS
CnCirA9	4	87	46	41	0.56	**
CnCirC3'	4	87	49	38	0.64	NS
CnCirC7	3	87	35	52	0.58	**
CnCir E2	4	87	42	45	0.57	**
CnCirE10	5	87	70	17	0.66	NS
CnCirE12	5	87	62	25	0.72	NS
CnCir F2	5	87	71	16	0.72	NS
CnCirH4'	4	87	57	30	0.68	NS
CnCirH7	4	87	70	17	0.68	NS

Keterangan/Note: TP = Tingkat polimorfisme (*Polymorphism level*)
 HW = Kesetimbangan Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg equilibrium*)
 ** = Tidak pada kesetimbangan Hardy-Weinberg (*Not in Hardy-Weinberg equilibrium*)
 NS = Pada kesetimbangan Hardy-Weinberg (*In Hardy-Weinberg equilibrium*)

Migrasi, mutasi dan seleksi adalah faktor-faktor penyebab terjadinya perubahan frekuensi gen dari generasi ke generasi dalam suatu populasi besar, sedangkan pada populasi kecil pemilihan sampel secara acak merupakan faktor yang lebih berperan dalam perubahan frekuensi gen dibandingkan faktor lainnya (Liu, 1998).

KESIMPULAN

Penanda molekular mikrosatelit (SSR) adalah penanda DNA yang tepat untuk menganalisis depresi silangdalam, dan melacak hubungan kekerabatan pohon-pohon kelapa DMT-32 penyerbukan sendiri. Sifat mikrosatelit yang kodominan memungkinkan membedakan individu-individu homozigot dan heterozigot suatu populasi. Persentase depresi silangdalam pada kelapa Dalam Mapanget No. 32 berdasarkan penanda mikrosatelit memiliki kecenderungan semakin meningkat pada setiap generasi. Beberapa lokus SSR yang digunakan tidak lagi berada pada keseimbangan Hardy-Weinberg artinya dengan penyerbukan sendiri yang dilakukan pada tanaman kelapa Dalam Mapanget No. 32 telah mengakibatkan beberapa lokus SSR tidak lagi diwariskan secara bebas. Kelapa Dalam Mapanget 32 generasi S4 telah dapat digunakan sebagai materi persilangan untuk mendapatkan turunan dengan tingkat heterosis tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Allard RW. 1960. Principle of plant breeding. John Willey & Sons. Inc. New York. p.485.
- Akuba RH. 2002. Breeding and population genetics studies on coconut (*Cocos nucifera* L) composite variety using morphological and microsatellite markers. Disertasi Doktor. University of Philippines Los Banos.
- Child R. 1974. Coconuts, 2nd edition, Longmans, Green & Co. London. p.355.
- [Cirad] Centre for International Cooperation in Agricultural Research for Development. 2002. A Laboratory Manual. Coconut Microsatellite Kit. Training session, april 15-24, Cirad, Montpellier, France.
- Creste S, Tullman - Neto A, Figuera A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol Bio Rep* 19:299-306.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Ltd. p.464.
- Filho MJB. 1997. Inbreeding and heterosis. The genetics and exploitation of heterosis in crops. An International Symposium. Book of Abstracts. 17-22 August 1997. Mexico City. Mexico.
- Foale. 1992. Coconut genetic diversity. Present knowledge and future research needs. *In* Papers of the IBPGR workshop on Coconut Genetic Resources. 8-10 Oktober 1991, Cipanas, Indonesia. IBPGR Rome. p.46-55.
- Fremont Y, Ziller R, de Nuce de Lamothe M. 1966. The coconut palm. International Potash Inst. Switzerland. p.227.
- Hartl DL. 1988. A Primer of Population Genetics. Second Edition. Washington University. School of Medicine. p.49.
- Liu BH. 1998. Statistical genomics, linkage mapping and QTL

- analysis. CRC Press. New York. P.45-83.
- Menon KPV, Pandalai KM. 1960. The coconut palm a monograph. Indian Central Coconut Committee, Ernakulam-S. India. p.385.
- Novariant H. 1996. Varietas kelapa yang diinginkan petani, konservasi serta strategi pemulia-an kelapa. Laporan Bulanan Puslitbangtri. Bogor.
- Ott J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Amer J Hum Genet* 51:283-290.
- Ritland K. 1996. Inferring the genetics basis of inbreeding depression in plants. *Genome* 39:1-8.
- Rivera R, Edwards KJ, Barker JHA, Arnold GM, Ayad G, Hodgkin T, Karp A. 1999. Isolation and characterization of polymorphic micro-satellites in *Cocos nucifera* L. *Genom* 42:668-675.
- Rohde W, Kullaya A, Rodriguez J, Ritter E. 1995. Genome analysis of *Cocos nucifera* L by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like EcoR1 repetitive elements. *J. Genet. And Breed.* 49:170-186.
- Rompas T, Novariant H, Tampake H. 1989. Pengujian nomor-nomor terpilih Kelapa Dalam Mapanget di Kebun Percobaan Kima Atas. *Jurnal Penelitian Kelapa* 4(2):32-34
- Santos GA. 1996. Manual on standardized Research Techniques in Coconut Breeding. COGENT, IPGRI.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York.
- Smouse P. 1986. The fitness consequences of multiple-locus heterozygosity under the multiplicative overdominance and inbreeding depression models. *Evolution* 40(5): 946-957.
- Stebbins GL. 1958. The inviability weakness and sterility of interspecific hybrids. *Advance Genetic* 9:147-771.
- Tampake H. 1987. Keragaman genetik dan fenotip pada tanaman kelapa Dalam Kima Atas. *Jurnal Penelitian Kelapa* 2(1) : 10 – 13.
- Williams RR. 1970. Factors affecting pollination in fruit trees, Physiology of tree crops, Academic Press London-New York, 193-207.
- Yeah FC, Yang RC, Boyle T. 2001. POPGENE ver. 1.32. <http://www.ualberta.ca/~fyeah/index.htm>.