

Analisis AFLP pada Abnormalitas Klon-klon Kelapa Sawit (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Hasil Kultur Jaringan yang Berbuah Normal dan Abnormal

AFLP Analysis of Oil Palm (Elaeis Guineensis Jacq.) Clone Abnormality From Tissue Culture Which Showed Normal Fruits and Abnormal Fruits

Endang Yuniastuti¹⁾, R. Setiamihardja²⁾, M.H. Karmana²⁾, N. Toruan-Mathius³⁾

ABSTRACT

Study on DNA through AFLP analysis revealed primers which differentiated genotypes (male flowered genotype, normal fruited genotype, and abnormal fruited genotype) within clone and interclonal, i.e. EcoRI ACT/MseI + CAA, EcoRI ACA/MseI + CAG, EcoRI AAG/MseI + CAC, EcoRI AGG/MseI + CAA, EcoRI AGG/MseI + CTA, and EcoRI AGC/MseI + CAA. Molecular weight of DNA on zymogram bands pattern were different on each clone. Genetic similarity among clones and among genotypes were high, more than 85 % indicated close genetic distance. Dendrogram based on matrix of genetic similarity indicated grouping on each genotype.

Keywords: Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.), AFLP

PENDAHULUAN

Penyediaan bibit kelapa sawit dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara generatif dan secara vegetatif. Perbanyak generatif menggunakan benih dari biji hasil persilangan Dura dengan Pisifera. (Lubis, 1992). Perbanyak secara vegetatif, salah satunya dilakukan dengan teknik kultur jaringan. Salah satu keunggulan teknik kultur jaringan adalah mampu menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. (Ginting *et al.*, 1991).

Duran-Gasselin *et al.* (1993) menyatakan bahwa kelapa sawit hasil kultur jaringan meningkatkan produksi minyak sawit mentah (MSM) sekitar 12% sampai 30% dibandingkan dengan tanaman yang berasal dari benih hibrida. Namun, dalam perkembangan beberapa tahun terakhir, ternyata tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan yang ada di lapangan menunjukkan gejala abnormalitas yang dijumpai pada organ generatif, yaitu pada bunga dan buah seperti yang dilaporkan pada Konferensi Kultur Jaringan Kelapa Sawit di Kuala Lumpur pada bulan Maret 1986.

Beberapa pendapat menyatakan bahwa mekanisme munculnya abnormalitas berbeda-beda untuk setiap genotip dan klon tanaman kelapa sawit. Pengamatan genotipik pada tingkat DNA tidak dipengaruhi oleh umur

tanaman atau faktor lingkungan sehingga sama pada setiap fase atau tahap pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Analisis pada tingkat DNA dapat digunakan untuk deteksi sedini mungkin pada fase pembibitan atau bahkan saat perbanyak dalam kultur jaringan, khususnya tanaman perkebunan seperti tanaman kelapa sawit. Dengan demikian program pemuliaan tanaman dalam melakukan seleksi akan dipercepat, sehingga dapat memberi rekomendasi lebih awal.

BAHAN DAN METODE

DNA tanaman kelapa sawit yang digunakan untuk analisis AFLP adalah tiga klon kelapa sawit hasil kultur jaringan yang merupakan koleksi kebun percobaan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) di Ciampea yang berumur lima tahun yaitu MK 152, MK 209, dan MK 212. Bagian tanaman kelapa sawit yang diambil dalam adalah daun yang masih muda yang disebut daun tombak dari klon kelapa sawit yang berbunga jantan, berbuah normal, dan berbuah abnormal (mantel berat).

Analisis DNA dengan teknik AFLP dilakukan mengikuti prosedur dari Gibco BRL AFLP Analysis System I (Cat. No. 10544) dengan modifikasi tanpa pelabelan primer. Analisis DNA yang dilakukan dengan teknik AFLP terdiri atas beberapa tahapan, yaitu isolasi

1. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta
2. Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, UNPAD
3. Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor

DNA genom diamati, uji kuantitas dan kualitas DNA, dan analisis polimorfisme yang menggunakan primer selektif. Amplifikasi selektif menggunakan primer selektif yang sama dengan primer pre-amplifikasi, tetapi masing-masing ditambahkan dua nukleotida yang berbeda. Teknik AFLP dilakukan dengan dasar penggunaan PCR yang dikombinasikan dengan menggunakan enzim restriksi yang berfungsi untuk memotong-motong DNA genom pada situs tertentu, tergantung pada enzim restriksi yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan 20 pasang

primer selektif (Tabel 1.) yang selanjutnya dipilih pasangan primer selektif yang dapat digunakan untuk analisis abnormalitas pada klon kelapa sawit hasil kultur jaringan yaitu berdasarkan jumlah pita DNA yang dihasilkan tegas dan banyak. Penetapan pasangan primer selektif hasil seleksi untuk pengujian tingkat polimorfisme klon tanaman kelapa sawit hasil kultur jaringan adalah berdasarkan jumlah pita DNA yang dihasilkan tegas dan terbanyak. Dari 20 pasangan primer selektif, ada 11 pasangan primer yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 1. Pasangan primer selektif yang digunakan dalam analisis AFLP sembilan genotipe kelapa sawit hasil kultur jaringan

No.	Pasangan Primer	No.	Pasangan Primer
1.	<i>EcoRI</i> + AAC/MseI+CAA	11.	<i>EcoRI</i> + ACT/MseI+CAA
2.	<i>EcoRI</i> + AAC/MseI+CTT	12.	<i>EcoRI</i> + ACT/MseI+CAG
3.	<i>EcoRI</i> + AAG/MseI+CAA	13.	<i>EcoRI</i> + ACT/MseI+CAT
4.	<i>EcoRI</i> + AAG/MseI+CAC	14.	<i>EcoRI</i> + AGC/MseI+CTT
5.	<i>EcoRI</i> +ACA/MseI+CAG	15.	<i>EcoRI</i> +AGC/MseI+CAA
6.	<i>EcoRI</i> +ACA/MseI+CAT	16.	<i>EcoRI</i> +ACG/MseI+CAG
7.	<i>EcoRI</i> +ACC/MseI+CTA	17.	<i>EcoRI</i> +AGC/MseI+CTA
8.	<i>EcoRI</i> +ACC/MseI+CAC	18.	<i>EcoRI</i> +AGC/MseI+CTG
9.	<i>EcoRI</i> +ACG/MseI+CAA	19.	<i>EcoRI</i> +AGC/MseI+CAA
10.	<i>EcoRI</i> +CGC/MseI+CAT	20.	<i>EcoRI</i> +AGC/MseI+CTA

foresis AFLP berdasarkan penampilan pola pita DNA menggunakan analisis gerombol (cluster analysis) dengan teknik berhierarki yang ada dalam program Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System versi 2.10 (NTSYS) metode Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested Clustering (SAHN) (Rohlf, 1993).

Selanjutnya pengelompokan itu ditampilkan dalam bentuk dendrogram (Franco et al., 1997). Ukuran derajat jarak kemiripan genetik antara klon berdasarkan koefisien kemiripan (similarity coefficient) atau jarak genetik (genetic distance) dengan menggunakan metode Group Average Clustering yang ada dalam program NTSYS dipilih metode Unweight PairGroup Method Arithmetic (UPGMA). Dari analisis kluster dengan metode UPGMA diperoleh dendrogram. Untuk meningkatkan akurasi hasil, dilakukan analisis bootstrap dengan ulangan 2000 kali. Dengan demikian, diperoleh angka-angka yang merupakan persentase tingkat ketelitian. Angka-angka pada garpu dendrogram hasil analisis bootstrap pada dasarnya menunjukkan tingkat kepercayaan pengelompokan dendrogram berdasarkan koefisien kemiripan genetik. Jika jarak genetik antar

tinggi, dilanjutkan Analisis Komponen Utama (AKU) untuk mendapatkan nilai skor yang dapat digunakan untuk melihat posisi relatif setiap genotip berdasarkan tiga komponen utama pertama yang memiliki proporsi varians yang terbesar.

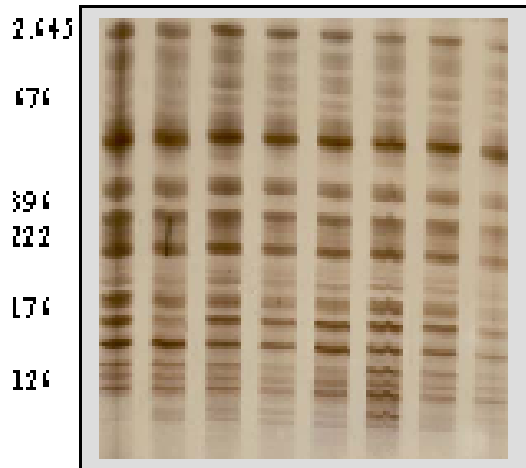
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Polimorfisme DNA dengan Teknik

Pola pita DNA yang dihasilkan dari elektroforesis gel poliakrilamid dengan teknik AFLP tertera dalam Gambar 1.

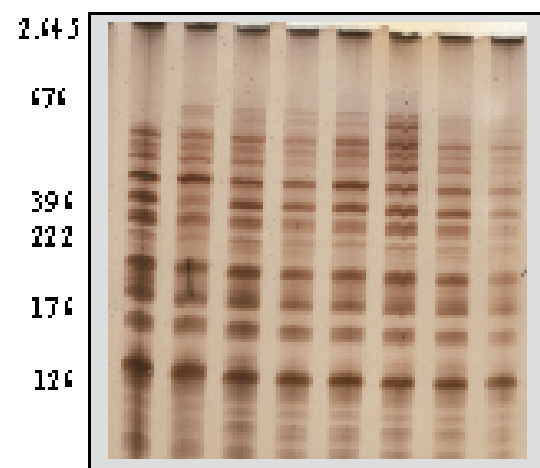
Total pita yang dihasilkan adalah sebanyak 264 dan 49 di antaranya adalah pita DNA yang polimorfis. Dari 11 primer AFLP yang diamati ada 8 primer yang dapat digunakan untuk membedakan genotip jantan, normal dan abnormal pada semua klon (Tabel 2.), yaitu *EcoRI* ACT/MseI + CAA, *EcoRI* ACA/MseI + CAG, *EcoRI* AAG/MseI + CAC, *EcoRI* AGG/MseI + CAA, *EcoRI* AGG/MseI + CTA, *EcoRI* AGC/MseI + CAA, *EcoRI* AGC/MseI + CAG, *EcoRI* ACG/MseI + CAT.

pb 1 2 3 4 5 6 7 8 9



(i) *EcoRI*+ACTI/*ddeI*+CAA

pb 1 2 3 4 5 6 7 8 9



(ii) *EcoRI*+ACA/*ddeI*+CAG

G.

Keterangan: 1 = MK 152?; 2 = MK 152 Abnormal; 3 = MK 152 Normal; 4 = MK 209?; 5 = MK 209 Abnormal; 6 = MK 209 Normal; 7 = MK 212?; 8 = Mk 212 Abnormal; 9 = MK 212 Normal

Tabel 2. Pasangan praimer selektif AFLP yang mampu membedakan genotip jantan, normal, dan abnormal pada semua klon yang diamati

Primer Selektif AFLP	?	Genotip	
		Abnormal	Normal
<i>EcoRI</i> ACI/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 11 (350 bp)	0	0	1
<i>EcoRI</i> ACAI/ <i>ddeI</i> +CAG Pita No. 24 (50 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAC Pita No. 12 (394 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 15 (394 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 17 (350 bp)	0	0	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 18 (340 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CIA Pita No. 9 (400 bp)	1	0	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 14 (394 bp)	0	0	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAA Pita No. 2 (1405 bp)	0	0	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAG Pita No. 23 (50 bp)	0	1	0
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAG Pita No. 12 (124 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAI Pita No. 9 (500 bp)	0	1	1
<i>EcoRI</i> ACG/ <i>ddeI</i> +CAI Pita No. 12 (430 bp)	0	0	1

B. Analisis Kemiripan Genetik Pola Pita DNA Hasil

AFLP

Tabel kemiripan genetik (Tabel 3) berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi 11 pasang primer selektif dengan AFLP menunjukkan bahwa tingkat kemiripan antara genotip yang satu dan lainnya dalam satu klon ataupun antar klon adalah cukup tinggi yaitu antara 0.92 sampai 0.99.

Tingginya tingkat kemiripan genetik menunjukkan bahwa kekerabatan antar klon sangat dekat, perubahan pita DNA pada genotip dalam satu klon yang sama dan antar klon yang berbeda juga sangat dekat. Dapat disimpulkan bahwa perubahan DNA yang sangat tidak signifikan mampu menyebabkan perubahan fenotipik yang cukup besar, khususnya dalam organ seksual tanaman kelapa sawit.

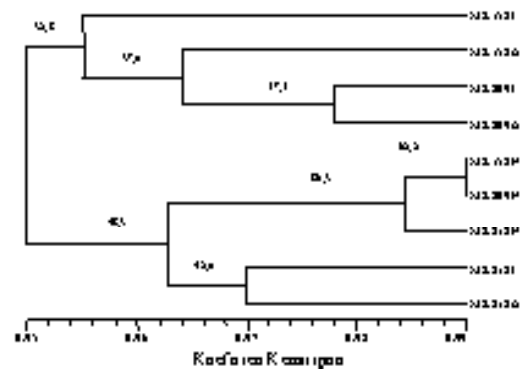
Tabel 3. Matrik kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi dari 11 pasangan praimer selektif dengan AFLP

Genotipe	MK 152?	MK 152Ab	MK 152N	MK 209?	MK 209Ab	MK 209N	MK 212?	MK 212Ab	MK 212N
MK 152?	1.00								
MK 152Ab	0.94	1.00							
MK 152N	0.94	0.95	1.00						
MK 209?	0.94	0.95	0.95	1.00					
MK 209Ab	0.94	0.97	0.95	0.98	1.00				
MK 209N	0.92	0.94	0.99	0.94	0.94	1.00			
MK 212?	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.95	1.00		
MK 212Ab	0.94	0.95	0.94	0.94	0.97	0.95	0.97	1.00	
MK 212N	0.93	0.94	0.99	0.94	0.95	0.98	0.97	0.97	1.00

Hasil pengelompokan berdasarkan UPGMA menunjukkan bahwa seluruh genotip yang diuji mengelompok menjadi dua pada tingkat kemiripan genetik 95%. Kelompok I adalah genotip abnormal dari klon MK152 dan MK 209. Sedangkan kelompok ke II adalah klon MK152, MK 209 dan MK 212 Normal serta MK 212 abnormal. Kelompok II terpisah menjadi dua subkelompok pada tingkat kemiripan genetik 96 % yaitu MK 152, 209 dan 212 normal serta MK212 abnormal.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa klon MK152 dan MK 209 mempunyai tingkat kemiripan genetik 99% yang berarti keduanya sebenarnya adalah satu klon yang sama. Namun klon abnormal baik yang berbunga jantan maupun berbuah mantel dari masing-masing klon menunjukkan adanya perbedaan. Hal ini juga merupakan suatu bukti bahwa genotipik sangat mempengaruhi perubahan fenotipik.

Dari tabel matrik kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi dari 11 pasangan praimer selektif dengan AFLP (Tabel 3) dilakukan analisis ordinat dengan menggunakan analisis Komponen Utama (AKU) untuk mendapatkan nilai skor yang digunakan untuk melihat posisi relatif setiap genotipe berdasarkan tiga komponen utama pertama yang memiliki proporsi varian yang terbesar (Tabel 4).



Gambar 2. Dendrogram hasil analisis klaster berdasarkan pola pita DNA dengan metode UPGMA pada analisis AFLP klon kelapa sawit.

Keterangan: Skala di bawah adalah angka tingkat kemiripan koefisien Dice, sedangkan angka-angka pada garpu dendrogram adalah persentase tingkat ketelitian setelah dianalisis bootstrap 2000 kali dengan program Winboot.

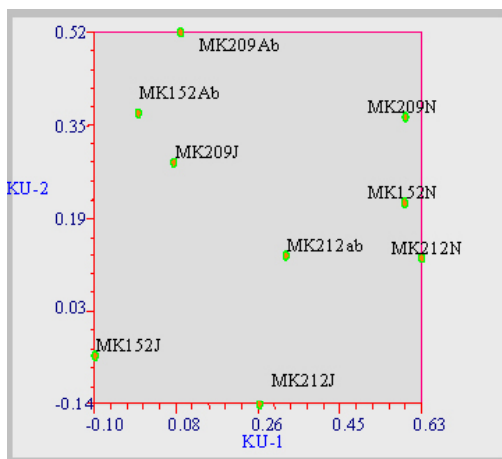
Tabel 4. Data skor hasil analisis komponen utama genotip klon kelapa sawit hasil kultur jaringan berdasarkan pola pola DNA dari 11 pasang primer selektif dengan teknik AFLP

No.	Genotipe	KU-1	KU-2	KU-3	KU-4
1	MK152 ♀	-0.04	-0.02	-0.002	0.05
2	MK152 Ab	-0.00	0.17	-0.14	0.04
3	MK152 N	0.24	0.10	-0.01	0.05
4	MK209 ♀	0.03	0.13	0.12	-0.09
5	MK209 Ab	0.04	0.23	-0.03	-0.11
6	MK209 N	0.24	0.14	0.05	-0.01
7	MK212 ♀	0.12	-0.04	0.01	-0.11
8	MK212 Ab	0.14	0.04	-0.15	-0.15
9	MK212 N	0.28	0.05	-0.07	-0.04

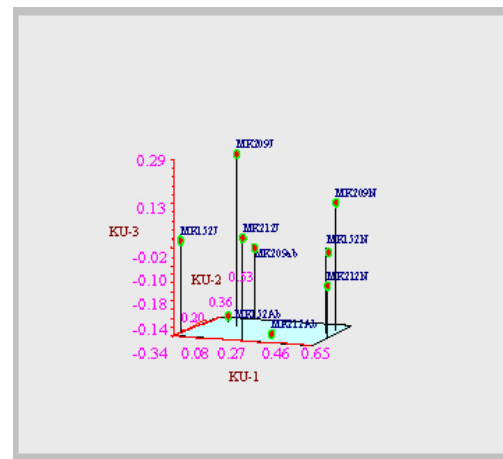
Keterangan: setiap angka analisis komponen utama dipresentasikan dalam angka mutlak dan juga persentase terhadap ragam total

Seperti pengelompokan yang diperoleh pada analisis kluster, maka pengelompokan yang diperoleh dari pemetaan antara komponen utama satu (KU-1) dengan komponen utama dua (KU-2) dan komponen utama tiga (KU-3) juga memperlihatkan pengelompokan pada geno-

tip klon kelapa sawit berbuah normal (Gambar 2). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pengelompokan yang diperoleh dari analisis komponen utama mendukung pengelompokan kluster pada metode UPGMA.



(i)



(ii)

Gambar 2. (i) Pemetaan (KU-1) dan (KU-2); (ii) Pemetaan KU-1, KU-2, dan KU-3 klon kelapa sawit hasil kultur jaringan MK 152, MK209, MK 212 yang masing-masing klon kelapa sawit terdiri atas genotip berbunga jantan, berbuah normal dan abnormal

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan yaitu:

1. Pasangan praimer selektif AFLP yang mampu membedakan genotip jantan, normal dan abnormal pada klon MK 152, MK 209, dan MK 212, yaitu *EcoRI* ACT/*MseI* + CAA, *EcoRI* ACA/*MseI* + CAG, *EcoRI* AAG/*MseI* + CAC, *EcoRI* AGG/*MseI* + CAA, *EcoRI* AGG/*MseI* + CTA, dan *EcoRI* AGC/*MseI* + CAA
2. Pola pita DNA *polimorfik* AFLP berbeda-beda untuk

masing-masing klon yang diamati

3. Kemiripan genetik antar klon MK dan antar genotip sangat tinggi yaitu 92 % - 99%, yang berarti jarak genetiknya sangat dekat.
4. Perubahan genotipik yang kecil dapat menimbulkan perubahan fenotipik yang besar.
5. Dendrogram menunjukkan bahwa genotip normal berada dalam kelompok yang sama, sedang genotip abnormal (berbunga jantan dan berbuah abnormal) berada dalam kelompok lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Duran-Gasselin, T.Y. Duval, L. Baudouin, A.B. Maheeran, K. Konan, and J.M. Noiret. 1993. Description and Degree of the Mantled Flowering Abnormality in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clones Produced Using the Orstom-CIRAD Procedure. p.33 – 47. In: V. Rao, I.E. Henson, and Rajanaidu (Ed.). Proc. 1993. ISOPB Int. Symp. Recent Dev. In *Oil Palm Tissue Culture and Biotechnology*. Kuala Lumpur, 24 – 25 September. 1993.
- Franco, J., J. Crossa, J. Vilasenor, S. Taba and B.A. Eberhart. 1997. Classifying Mexican Maize Accession Using Hierarchical and Density Search Methods. *Crop Sci.* 37:972-980.
- Ginting, G., R.A. Lubis, dan A.U. Lubis. 1991. *Kultur Jaringan Kelapa Sawit (Elaeis guineensis) di Pusat Penelitian Perkebunan Marihat*. Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer PAU-IPB Bogor. p.115 - 119.
- JICA. 1996. *Manual of Protein and DNA Analysis*. National Institute of Agrobiological Resources. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. Tsukuba. Japan. 57 p.
- Jones, L.H. 1991. Endogenous Cytokinins in Oil Palm (*Elaeis guineensis* L.) Callus, Embryoids and Replant Plants Measured by Radioimmunoassay. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 20: 201 – 210.
- Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295-302.
- Lubis, A.U. 1992. *Kelapa Sawit di Indonesia*. Pusat Penelitian Perkebunan Marihat. Bandar Kuala, Sumatra Utara. 435 p.
- Nei, M. 1987. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals: *Genet.* 89 : 583 – 590.
- Nienhuis, J., J. Tivang, and P. Skroch. 1994. Analysis of Genetic Relationship Among Genotypes Based on Molecular Marker data. p. 4-8. In: *Analysis Molecular Marker Data*. Joint Plant Breeding Symposia Series. Corvallis, Or 5 – 6 August, 1994. CSSA Am Soc. Hort. Sci. and Am Genet. Assoc.
- Rohlf, F.J. 1993. *NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.80*. Exeter Software, New York.
- Toruan-Mathius, N., N. Haris, and G. Ginting. 1998. *Use of Biomolecular Techniques in Studies of Abnormalities in Oil Palm Clones*. Int. Oil Palm Conf. Nusa Dua, Bali. September 23 – 25 1998. Indonesia.