

METODE *BULKING* HASIL AMPLIKON PCR-SSR TANPA *OVERLAPPING* ALEL PADA KELAPA SAWIT POPULASI ANGOLA TIPE *WILD*

Rokhana Faizah*, Nanang Supena, Sujadi, dan Sri Wening

Abstrak - Introduksi populasi dari luar ke dalam suatu program pemuliaan kelapa sawit diperlukan untuk meningkatkan keragaman genetik populasi yang telah ada sebelumnya. Populasi kelapa sawit tipe *wild* dari Angola merupakan salah satu populasi yang diintroduksi ke Indonesia pada 2010. Karakter-karakter yang dimiliki oleh populasi tersebut perlu dieksplorasi lebih lanjut, baik karakter fenotipe maupun genotipe. Teknologi biologi molekuler dapat dimanfaatkan untuk mengetahui keragaman genetik populasi tersebut berdasarkan data genotipe. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik PCR-SSR (*Polymerase Chain Reaction-Simple Sequence Repeat*) pada analisis keragaman genetik populasi Angola tersebut. Sebanyak 4 sampel dari aksesori yang berbeda dan 3 sampel kontrol *dura* Deli digunakan pada percobaan ini. Analisis PCR-SSR dilakukan dengan menggunakan 8 marka SSR yang berbeda digabung menjadi satu (*bulking*) pada analisis fragmen DNA, dengan memanfaatkan primer label fluorosen yang berbeda. Berdasarkan hasil analisis fragmen DNA, alel-alel pada populasi Angola yang diuji memiliki panjang fragmen berkisar antara 138 bp hingga 328 bp. Hasil optimasi metode PCR-SSR yang telah dilakukan pada populasi Angola tipe *wild* yang diuji mampu menghilangkan kemungkinan *overlapping* alel-alel marka SSR yang berbeda pada penggunaan label fluorosen yang sama, dan meminimalkan biaya analisis fragmen DNA. Namun, hasil tersebut perlu dilakukan optimasi lebih lanjut pada material kelapa sawit *advanced*. Kekerabatan genetik populasi Angola tipe *wild* yang dianalisis termasuk tinggi dan berpotensi untuk pengembangan bahan tanaman unggul.

Kata kunci: populasi Angola tipe *wild*, material genetik introduksi, PCR-SSR, kekerabatan genetik, kelapa sawit

PENDAHULUAN

Peningkatan keragaman genetik dapat dilakukan dengan mendatangkan material genetik dari luar ke dalam suatu program pemuliaan kelapa sawit dalam kegiatan introduksi plasma nutfah (Arias et al., 2013). Pada 2010-2011, beberapa perusahaan kelapa sawit Indonesia membentuk konsorsium untuk melakukan introduksi populasi *wild* dari Angola, Afrika bagian barat daya. Populasi kelapa sawit tipe *wild* dari Angola merupakan salah satu populasi yang diintroduksi ke Indonesia dimana karakter-karakter yang dimiliki hingga saat ini perlu dieksplorasi lebih lanjut, baik karakter fenotipe maupun genotipe (Arias et al., 2013; Ong et al., 2018; Sujadi et al., 2019). Tujuan lain dari introduksi ini antara lain untuk memperluas keragaman genetik pada populasi program pemuliaan yang telah

diseleksi beberapa generasi dan semakin sempitnya keragaman karakter karena seleksi yang berulang (Almeida et al., 2021).

Upaya eksplorasi dan eksploitasi karakter yang dimiliki pada populasi Angola tipe *wild* antara lain dengan mengetahui keragaman genetik melalui pengumpulan data fenotipe maupun genotipe (Adon et al., 2021; Maskromo et al., 2017; Natawijaya et al., 2019). Teknologi biologi molekuler dapat dimanfaatkan untuk mengetahui keragaman genetik populasi tersebut berdasarkan data genotipe (Arias et al., 2013; Natawijaya et al., 2019; Nugroho et al., 2019). Keunggulan teknologi ini antara lain data yang diperoleh tidak dipengaruhi faktor lingkungan, dapat dimanfaatkan berulang-ulang untuk tujuan analisis data tertentu, dan dapat dibedakan antar individu (Natawijaya et al., 2019). Metode PCR-SSR yang telah dikembangkan untuk analisis keragaman genetik pada populasi program pemuliaan kelapa sawit saat ini mampu digunakan untuk menganalisis plasma nutfah program pemuliaan yang telah diseleksi beberapa generasi, namun untuk populasi *wild* Angola masih

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Rokhana Faizah (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamsno No. 51 Medan 20158, Indonesia

Email: nana_rfz@yahoo.com

memerlukan pengembangan teknik analisis yang telah ada (Maskromo et al., 2017; Sayekti et al., 2015).

Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) telah mengembangkan teknik *bulking* hasil amplikon PCR-SSR yang digunakan pada populasi program pemuliaan sejak 2013 (Wening & Yenni, 2013). Aplikasi teknik tersebut juga dikembangkan pada sidik jari DNA dan keragaman genetik populasi *wild* Kamerun (Wening et al., 2014). Namun metode tersebut perlu diaplikasikan pada populasi Angola *wild*. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik kelapa sawit menggunakan marka SSR pada populasi Angola (Natawijaya et al., 2019; Sayekti et al., 2015). Untuk itu, tujuan dari penelitian

adalah mendapatkan teknik metode *bulking* hasil amplikon PCR-SSR (*Polymerase Chain Reaction-Simple Sequence Repeat*) untuk menghindari *overlapping* alel-alel yang teramplifikasi pada analisis keragaman genetik populasi Angola tipe *wild*.

BAHAN DAN METODE

Material genetik

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 individu pada aksesi yang berbeda di populasi Angola *wild* dan 3 individu kontrol *Dura* Deli yang telah diseleksi beberapa generasi (Tabel 1).

Tabel 1. Daftar pohon dari 4 aksesi populasi Angola

No.	Aksesi	Kode unik DNA	Kebun percobaan	No. lapangan
1.	AGO003	20161003042	AD17S	11-28
2.	AGO089	20161004044	AD17S	19-24
3.	AGO109	20161003013	AD17S	11-7
4.	AGO110	20161010020	KL05S	56-25

Metode penelitian

Sebanyak 50 mg jaringan daun diekstraksi DNA nya menggunakan prosedur tahapan dari *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Plant)* dengan Catalog. No. GP100. Pengambilan sampel sesuai dengan prosedur di Laboratorium Biologi Molekuler PPKS. Sebanyak delapan primer SSR (Billotte et al., 2005) yang berasal dari delapan lokus SSR mEgCIR3555, mEgCIR0894, mEgCIR3311, mEgCIR0783, mEgCIR3691, mEgCIR0257, mEgCIR3400, dan mEgCIR3546. Terdapat empat label fluorosen M13, yaitu 6-FAM, HEX, NED, dan ROX diaplikasikan pada proses amplifikasi PCR-SSR (Wening & Yenni, 2013) dengan total sampel yang dianalisis sebanyak 72 *tubes*. Marka SSR tersebut berasal dari 8 kromosom yang berbeda pada kelapa sawit dan digabung menjadi satu (*bulking*) pada analisis fragmen DNA (Tabel 2).

Analisis data

Data genotipe yang diperoleh dari jasa analisis

fragmen DNA-SSR 1ST BASE Malaysia selanjutnya dikuantitatif dan divisualisasi menggunakan program GeneMarker® Soft Genetics® LLC versi 4.0. Analisis frekuensi alel individu menggunakan program GenAEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Visualisasi *synthetic gel image*

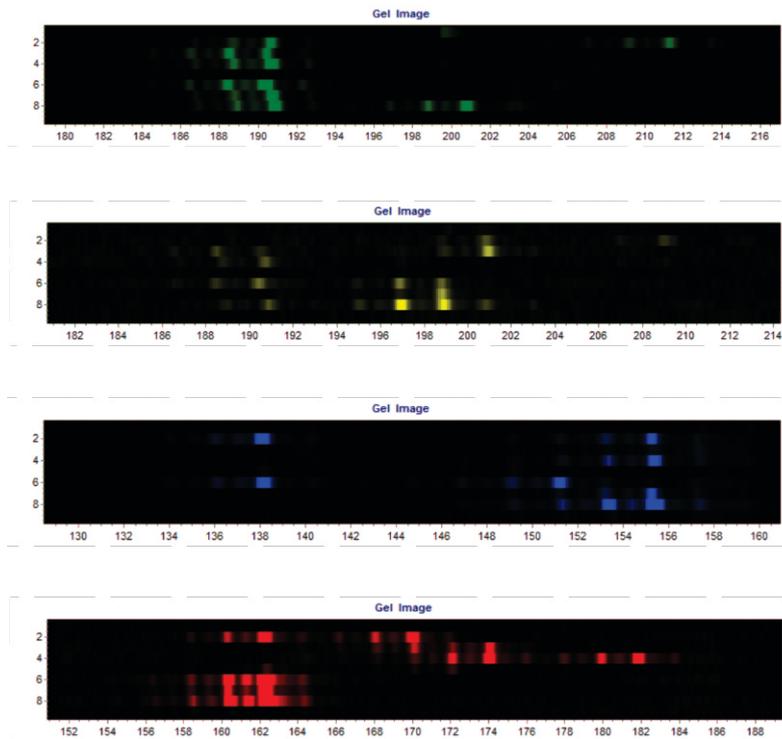
Visualisasi hasil amplifikasi PCR-SSR pada *synthetic gel image* menunjukkan bahwa metode optimalisasi *bulking* amplikon hasil PCR-SSR dapat membedakan alel-alel pada individu yang diuji. Label fluorosen yang digunakan mampu menggambarkan ukuran alel yang teramplifikasi dan potensi terjadinya *overlapping* dapat dihindari (Gambar 1). Hal ini ditunjukkan dengan adanya pemisahan ukuran alel-alel yang teramplifikasi menggunakan empat label fluorosen M-13. Pemisahan ukuran alel pada tiap primer yang dicoba menunjukkan intensitas fluoresensi yang diamati

untuk setiap SSR dapat mewakili hasil amplifikasi dalam reaksi multipleks, dan memungkinkan diperoleh marka antara pengujian independen untuk dibandingkan (Hayden et al., 2008). Keuntungan

menggunakan multipleks SSR-PCR menggunakan metode *capillary sequencer* antara lain ukuran alel yang jelas dan akurat dibandingkan dengan visual gel elektroforesis agarose.

Tabel 2. Deskripsi primer yang digunakan dalam penelitian.

No.	Nama lokus	Nomor aksesori EMBL	Motif berulang	Sekuen <i>forward</i> (F)	Sekuen <i>reverse</i> (R)	Lingkage group location (QTL)
1	mEgCl R3555	AJ578681	(GA)18	CATCAGAGCCTTC AAACTAC	AGCCTGAATTGCC TCTC	13
2	mEgCl R0894	AJ578562	(GA)18	TGCTTCTTGTCTT GATACA	CCACGTCTACGAA ATGATAA	07
3	mEgCl R3311	AJ578645	(GA)15	AATCCAAGTGGCC TACAG	CATGGCTTTGCTCA GTCA	12
4	mEgCl R0783	AJ578539	(GA)15	GAATGTGGCTGTA AATGCTGAGTG	AAGCCGCATGGAC AACTCTAGTAA	06
5	mEgCl R3691	AJ578705	(GA)14	GCATCATTGGACTA TCATACC	TTGTGAACCAGGG AACTATC	05
6	mEgCl R0257	AJ578509	(GA)17	GCAGCTAGTCACC TGAAC	GACGAGACTGGAA AGATG	01
7	mEgCl R3400	AJ578662	(GA)16	CAATTCCAGCGTC ACTATAG	AGTGGCAGTGGAA AAACAGT	11
8	mEgCl R3546	AJ578680	(GA)15	GCCTATCCCCTGA ACTATCT	TGCACATACCAGC AACAGAG	14



Gambar 1. Visualisasi ukuran dan verifikasi alel menggunakan *synthetic gel image* pada aplikasi GeneMarker SoftGenetic versi 4.0 berdasarkan pada 4 label fluorosen 6-FAM (biru), HEX (hijau), NED (kuning), dan ROX (merah) yang mampu menunjukkan posisi ukuran alel pada metode *bulking* hasil amplikon PCR-SSR.

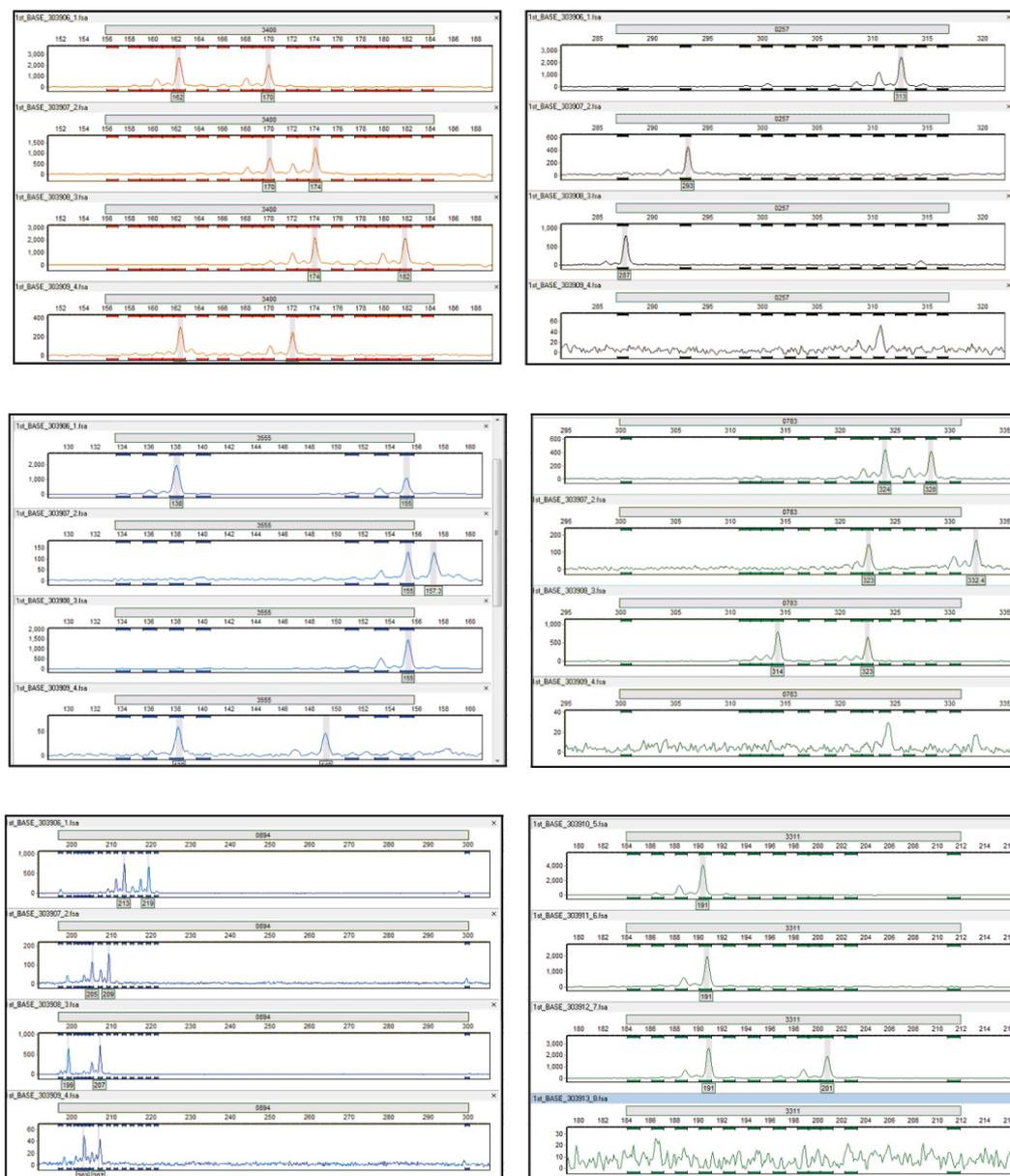
Analisis fragmen DNA

Berdasarkan analisis profil fragmen genomik pada individu populasi Angola menunjukkan grafik dan ukuran alel yang jelas pada masing-masing primer (Gambar 2). Ukuran alel yang teramplifikasi beragam, dari 190 dari 189 bp hingga 328 bp dengan

kemunculan 1-2 alel per individu (Gambar 2), namun secara keseluruhan aksesori Angola tipe *wild* dan *Dura Deli* berkisar antara 138 bp hingga 328 bp (Gambar 3). Amplikon produk PCR-SSR berkisar antara 2 hingga 7 alel per lokus pada populasi Angola tipe *wild*, namun berbeda dengan *Dura Deli* yang memiliki 1-2 alel per lokus pada setiap primer yang diuji (Tabel 3).

Tabel 3. Deskripsi amplikon tiap primer PCR-SSR

No.	Nama lokus	Kisaran alel	Jumlah alel per lokus	
			Angola tipe <i>wild</i>	<i>Dura Deli</i>
1	mEgCIR3555	138-155	3	1
2	mEgCIR0894	199-219	7	1
3	mEgCIR3311	189-211	4	2
4	mEgCIR0783	314-328	4	1
5	mEgCIR3691	191-209	5	2
6	mEgCIR0257	287-314	6	2
7	mEgCIR3400	162-182	4	1
8	mEgCIR3546	303-305	2	1



Gambar 2. Analisis profil fragmen genomik dan ukuran alel dari populasi Angola tipe *wild* pada enam marka SSR yang diikuti label fluorosen M-13

Pengembangan teknologi analisis fragmen DNA menggunakan *capillary sequencer* mampu memvisualisasikan amplicon PCR dengan jelas dan akurat. Alel-alel yang teramplifikasi pada Gambar 3 menunjukkan separasi yang jelas antar alel-alel per lokus. Penumpukan alel pada setiap primer yang di-*bulking* juga tidak nampak pada hasil analisis fragmennya. Hal tersebut menunjukkan tidak adanya

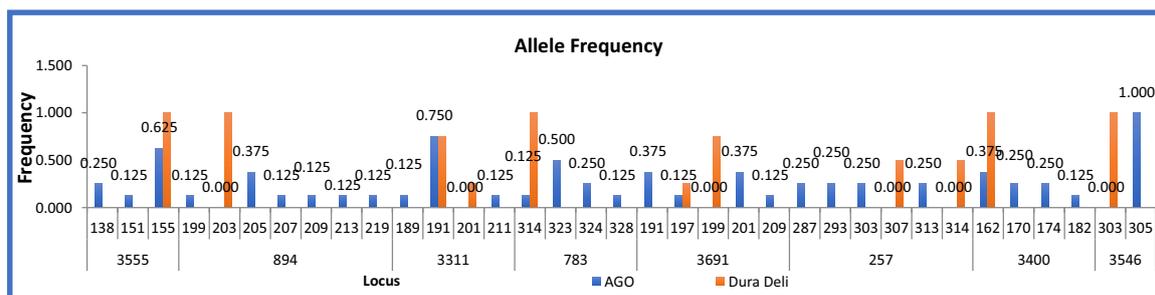
overlapping alel-alel marka PCR-SSR pada penggunaan label fluorosen yang sama. Teknologi ini mampu menunjukkan profil dan ukuran alel yang teramplifikasi dengan adanya puncak grafik pada ukuran alel yang teramplifikasi (Okoye et al. 2016). Dibandingkan dengan analisis fragmen menggunakan kualifikasi gel agarose, teknik *capillary sequencer* lebih efektif dan efisien (Pieri et al., 2020). Hal ini terlihat dari

visualisasi perbedaan posisi alel pada tiap individu. Selain itu juga, tingkat keakuratan data yang dihasilkan juga lebih tinggi dari kualifikasi gel *agarose* (Morca et al., 2022). Dengan demikian, metode *bulking* amplikon hasil PCR-SSR dengan 4 label fluoresen dapat digunakan untuk analisis frekuensi alel dan keragaman genetik populasi Angola tipe *wild*.

Frekuensi alel pada aksesori Angola tipe *wild*

Berdasarkan sampel yang digunakan, terdapat 35 alel yang teramplifikasi dengan rerata 4,37 alel per lokus (Gambar 3). Sebanyak 69,6% alel yang dimiliki oleh aksesori Angola tipe *wild* lebih tinggi dibandingkan *Dura Deli*. Terdapat beberapa alel yang hanya dimiliki oleh aksesori Angola, namun tidak dimiliki oleh *Dura Deli* (Gambar 3). Banyaknya alel spesifik pada aksesori Angola tipe *wild* menunjukkan populasi tersebut

memiliki kekerabatan genetik dengan kisaran yang luas (Gan et al., 2021) dibandingkan *Dura Deli*. Dari 8 lokus SSR yang diuji, *Dura Deli* menunjukkan 1-2 alel per lokus SSR. Namun, pada aksesori Angola sangat beragam ukuran alelnya, dari alel tunggal hingga enam alel per lokus SSR. Lebih lanjut, keragaman genetik di tiap aksesori Angola pada penelitian ini tidak dapat dijabarkan lebih detail karena keterbatasan sampel yang diuji tidak representatif untuk dianalisis datanya lebih lanjut. Namun, potensi untuk eksplorasi manfaat karakter spesifik pada aksesori Angola tersebut masih sangat terbuka dan luas pada program pemuliaan kelapa sawit (Gan et al., 2021; Mohd Din et al., 2022). Banyaknya alel yang dideteksi pada aksesori Angola memberikan peluang yang besar untuk mendapatkan karakter spesifik (Magos Brehm et al., 2022) yang tidak dimiliki pada tiga individu populasi *Dura Deli*.



Gambar 3. Frekuensi alel pada empat aksesori Angola AGO003, AGO089, AGO109, dan AGO110, serta tiga individu *dura Deli* kelapa sawit pada analisis *bulking* amplikon hasil PCR-SSR menggunakan 8 lokus SSR pada 8 kromosom yang berbeda.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis fragmen DNA, alel-alel pada populasi Angola dan *Dura Deli* yang diuji memiliki panjang fragmen berkisar antara 138 hingga 328 bp. Metode hasil *bulking* amplikon hasil PCR-SSR PCR-SSR pada aksesori Angola kelapa sawit tipe *wild* mampu meminimalisir kemungkinan *overlapping* alel-alel marka SSR yang berbeda pada penggunaan label fluoresen yang sama, dan berpotensi mampu menghemat biaya analisis fragmen DNA. Aksesori Angola tipe *wild* memiliki polimorfisme alel 69,6% lebih tinggi dari *Dura Deli*, kekerabatan genetik yang tinggi dan berpotensi untuk eksplorasi manfaat pada program pemuliaan kelapa sawit.

DAFTAR PUSTAKA

Adon, B., Konan, J. N., Cochard, B., Flori, A., Diabaté, S., Bakoumé, C., & Sokouri, D. P. (2021). Agronomical Performances of Angolan Natural Oil Palm Accessions and Interests for Oil Palm Selection in Côte d'Ivoire. *Journal of Agricultural Science*, 13(11), 64. <https://doi.org/10.5539/jas.v13n11p64>

Almeida, J., Fehn, A. M., Ferreira, M., Machado, T., Hagemeyer, T., Rocha, J., & Gayà-Vidal, M. (2021). The genes of freedom: Genome-wide insights into marronage, admixture and ethnogenesis in the gulf of guinea. *Genes*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/genes12060833>

- Arias, D., González, M., Prada, F., Restrepo, E., & Romero, H. (2013). Morpho-agronomic and molecular characterisation of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. material from Angola. *Tree Genetics and Genomes*, 9(5), 1283–1294. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0637-5>
- Billotte, N., Marseillac, N., Risterucci, A. M., Adon, B., Brottier, P., Baurens, F. C., Singh, R., Herrán, A., Asmady, H., Billot, C., Amblard, P., Durand-Gasselín, T., Courtois, B., Asmono, D., Cheah, S. C., Rohde, W., Ritter, E., & Charrier, A. (2005). Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(4), 754–765. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1901-8>
- Gan, S. T., Teo, C. J., Manirasa, S., Wong, W. C., & Wong, C. K. (2021). Assessment of genetic diversity and population structure of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) field genebank: A step towards molecular-assisted germplasm conservation. *PLoS ONE*, 16(7 July 2021), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255418>
- Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., & Chalmers, K. J. (2008). Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-80>
- Magos Brehm, J., Gaisberger, H., Kell, S., Parra-Quijano, M., Thormann, I., Dulloo, M. E., & Maxted, N. (2022). Planning complementary conservation of crop wild relative diversity in southern Africa. *Diversity and Distributions*, 28(7), 1358–1372. <https://doi.org/10.1111/ddi.13512>
- Maskromo, I., Natawijaya, A., Syafaruddin, S., Djufri, F., & Syakir, M. (2017). Variabilitas Genetik Plasma Nutfah Kelapa Sawit Asal Angola dan Seleksi Genotipe Berbasis Famili dan Individu untuk Pembentukan Breeding Population Baru. *Buletin Palma*, 18(1), 43. <https://doi.org/10.21082/bp.v18n1.2017.43-51>
- Mohd Din, A., Marhalil, M., Mohd Mustakim, M., Norhiza, A., Kushairi, A., & Rajanaidu, N. (2022). Field evaluation of oil palm genetic materials for partial resistance in *Ganoderma* hotspots of tropical peat soil. *Journal of Oil Palm Research*, 34(December), 657–667. <https://doi.org/10.21894/jopr.2022.0025>
- Morca, A. F., Yucel, C., Baris, A., Atakan, E., & Çelik, A. (2022). A novel capillary gel electrophoresis based fragment analysis method for the rapid detection of important thrips species on alfalfa in Turkey. *Bitki Koruma Bülteni*, 62(3), 5–11. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.1078737>
- Natawijaya, A., Ardie, S. W., Syukur, M., Maskromo, I., Hartana, A., & Sudarsono, S. (2019). Genetic structure and diversity between and within African and American oil palm species based on microsatellite markers. *Biodiversitas*, 20(5), 1233–1240. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200501>
- Nugroho, Y. A., Tanjung, Z. A., Yono, D., Mulyana, A. S., Simbolon, H. M., Ardi, A. S., Yong, Y. Y., Utomo, C., & Liwang, T. (2019). Genome-wide SNP-discovery and analysis of genetic diversity in oil palm using double digest restriction site associated DNA sequencing. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 293(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/293/1/012041>
- Ong, P. W., Maizatul, I., Marhalil, M., Rajanaidu, N., Abdullah, N. A. P., Rafii, M. Y., Ooi, L. C. L., Low, E. T., & Singh, R. (2018). Detached leaf assay for in vitro screening of potential biocontrol agents to control goosegrass weed (*Eleusine indica*). *Journal of Oil Palm Research*, 30(1), 61–70. <https://doi.org/10.21894/jopr.2017.0003>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pieri, M., Tomassetti, F., Iodice, C., Piazzolla, R., Riboldi, E., Capogreco, F., Innocenti, A., Frassanito, M. L., Bernardini, S., & Calugi, G. (2020). Our Laboratory Experience: Comparison of Capillary Electrophoresis/Immunosubtraction and

- Agarose Gel/Immunofixation. *Technium: Romanian Journal of Applied Sciences and Technology*, 2(7), 267–277. <https://doi.org/10.47577/technium.v2i7.2067>
- Sayekti, U., Widyastuti, U., & Toruan-Mathius, N. (2015). Keragaman Genetik Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Asal Angola Menggunakan Marka SSR. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 43(2), 140. <https://doi.org/10.24831/jai.v43i2.10420>
- Sujadi, Supena, N., & Suprianto, E. (2019). Karakteristik Perkembangan Bunga dan Buah 35 Aksesori Angola Koleksi Pusat Penelitian Kelapa Sawit di Kebun Adolina PT Perkebunan Nusantara IV. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, 27(2), 97–114.
- Wening, S., Faizah, R., Yenni, Y., & Purba, A. R. (2013). *Aplikasi sidik jari DNA dalam manajemen plasma nutfah kelapa sawit* (H. A. Hasibuan, R. Amalia, F. Hidayat, H. Y. Rahmadi, A. E. Prasetyo, S. Wening, V. D. Lelyana, R. Faizah, T. Herawan, & E. S. Sutarta (eds.); Prosiding). Pusat Penelitian Kelapa Sawit.
- Wening, S., Ningrum, D. A., Yenni, Y., & Purba, A. R. (2014). Analisis keragaman genetik kelapa sawit liar dari Kamerun menggunakan Simple Sequence Repeat. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, 22(3), 113–122.
- Wening, S., & Yenni, Y. (2013). *Optimasi analisa sidik jari DNA kelapa sawit* (H. A. Hasibuan, R. Amalia, F. Hidayat, H. Y. Rahmadi, A. E. Prasetyo, S. Wening, V. D. Lelyana, R. Faizah, T. Herawan, & E. S. Sutarta (eds.); Prosiding). Pusat Penelitian Kelapa Sawit.