

## **Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dengan Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

*Analysis normal and abnormal genotypes of oil palm clones (Elaeis guineensis Jacq.)  
by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

NuritaTORUAN-MATHIUS<sup>1)</sup>, ENDANG-YUNIASTUTI<sup>2)</sup>,  
Ridwan. SETIAMIHARJA<sup>3)</sup> & Murdaningsih H. KARMANA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Solo

<sup>3)</sup> Fakultas Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Bandung

### **Summary**

*Tissue culture-derived plants of oil palm may develop abnormal flowers in which primordial stamens are converted into carpel-like tissue or mantled fruits, and sterile male flowers. This abnormality can be heritable, individual palm may show variation in mantling and reversion to the normal phenotype over time has been observed. The aim of these experiments was to analyze the differences between normal and abnormal genotypes by DNA-AFLP. DNA was isolated from young fruits of three clones, MK152, MK209, and MK 212 each of them consisted of normal fruits, abnormal fruits and sterile male flowers. The research consisted of (i) selection of AFLP primer which can produce polymorphic bands, (ii) genetic similarities analysis, UPGMA, principal component analysis and specific DNA bands between normal or abnormal genotypes. For primers selection, 20 AFLP primers with DNA from MK 152 normal and abnormal genotypes were used. The selected primers were then used to amplify DNA of nine genotypes. The results show that 10 primer combinations EcoRV/MseI produced polymorphic bands. Each primer from 10 primer produced only one or two DNA bands indicates that the differences between normal and abnormal*

*genotypes in the same clone. However, no polymorphism was consistently found between normal and abnormal clones in all the sets. Genetic similarity analysis shows that between genotype had high genetic similarities, around 92-99%. The results of UPGMA found the different clustering between normal fruit, abnormal male and abnormal fruits. The results show same as clustering based on first, second and third component. This suggest that, whilst AFLP method is an effective way of detecting variation in tissue culture-derived plants, different approaches are required to identify the casual basis of the mantled fruit abnormality.*

[Key words: Oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq, soma-clonal variation, tissue culture AFLP, genetic similarity, UPGMA]

### **Ringkasan**

Tanaman kelapa sawit yang dihasilkan dari kultur jaringan, umumnya dalam perkembangannya akan memiliki organ reproduktif yang abnormal. Abnormalitas berupa primordial stamen berkembang menjadi bentuk jaringan seperti karpel, buah mantel, atau bunga jantan mandul. Penelitian ini bertujuan untuk

mendapatkan pembeda DNA-AFLP antara genotip normal dan abnormal pada klon-klon kelapa sawit. DNA diisolasi dari buah muda klon MK 152, MK 209, dan MK 212 yang masing-masing terdiri atas genotip normal, berbuah abnormal, dan berbunga jantan steril. Percobaan mencakup (i) seleksi primer AFLP yang mampu menghasilkan pita yang polimorfis, (ii) analisis kemiripan genetik, UPGMA, komponen utama dan pita pembeda antar genotip normal dan abnormal. Seleksi primer dilakukan terhadap 20 primer AFLP menggunakan DNA dari genotip MK 152 yang normal dan abnormal. Selanjutnya primer terpilih digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari kesembilan genotip yang diuji. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 10 kombinasi primer *EcoRI/MseI* mampu menghasilkan pita yang polimorfis. Dari 10 primer yang diuji, masing-masing hanya menghasilkan satu atau dua pita DNA yang mampu membedakan genotip normal dan abnormal dalam klon yang sama. Namun, tidak ada pita DNA spesifik yang mampu membedakan genotip normal dengan abnormal untuk seluruh klon yang diuji. Analisis kemiripan genetik menunjukkan bahwa antar genotip memiliki kemiripan genetik yang sangat tinggi, yaitu 92-99%. Dari hasil UPGMA diperoleh pengelompokan yang terpisah antar genotip normal, abnormal jantan dan buah abnormal. Hasil tersebut didukung oleh pengelompokan berdasarkan komponen utama satu, dua dan tiga. Dapat disimpulkan bahwa, teknik AFLP tidak efektif untuk mendeteksi pembeda antar genotip tanaman yang diperoleh dari kultur jaringan, pendekatan lainnya diperlukan untuk mengidentifikasi abnormalitas.

### Pendahuluan

Kelapa sawit merupakan tanaman penghasil minyak nabati utama di Indonesia, dan memegang peranan penting untuk: (i) memenuhi kebutuhan minyak nabati dalam negeri, (ii) menghasilkan penerimaan negara terbesar dari sektor perkebunan, (iii)

meningkatkan pendapatan petani, (iv) menggerakkan pembangunan, khususnya di luar Jawa, dan (v) digunakan sebagai bahan bakar biodiesel yang sifatnya dapat diperbaharui karena dihasilkan dari tanaman, dan ramah lingkungan.

Untuk meningkatkan peranan kelapa sawit dilakukan intensifikasi dan ekstensifikasi perkebunan kelapa sawit yang mengalami pertumbuhan sekitar 4% setahun, dengan kebutuhan bibit dalam periode tahun 2000 - 2009 adalah sebanyak 547.837.800 (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2004). Kendala yang dihadapi dalam penyediaan benih kelapa sawit adalah kebutuhan benih yang jauh melebihi kemampuan produsen untuk memproduksi benih, hal ini menyebabkan terjadinya (i) pemalsuan benih (tidak bersertifikat/ berlabel), yang menimbulkan kerugian yang sangat besar.

Bibit berasal dari benih palsu baru dapat diketahui setelah tanaman berproduksi (3-4 tahun setelah tanam), (ii) impor benih dari luar negeri, namun dikhawatirkan akan terbawanya hama dan penyakit dari negara asal yang akan mengancam industri perkelapa sawitan Indonesia. Di samping itu, sertifikasi dan pengawasan mutu benih belum sepenuhnya dapat dilaksanakan, sehingga saat ini diperkirakan terdapat sekitar 40% tanaman kelapa sawit rakyat menggunakan bibit palsu (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2004), dan (iii) tanaman kelapa sawit adalah heterozigos dan benih hibridanya sangat beragam. Untuk mengatasi kendala tersebut perbanyak bibit kelapa sawit melalui kultur jaringan perlu dilakukan.

Keunggulan teknik kultur jaringan adalah mampu menghasilkan bibit secara massal dalam waktu yang relatif singkat, seragam, sifatnya identik dengan induknya,

### *Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit...*

masa non produktif lebih singkat dan produktivitasnya lebih tinggi. Namun, timbulnya masalah abnormalitas pada organ reproduktif yang diketahui setelah tanaman berbunga dan berbuah (2-3 tahun setelah tanam), merupakan kendala yang harus diatasi. Timbulnya abnormalitas tersebut diduga disebabkan penggunaan 2,4-D yang tinggi untuk menginduksi pembentukan kalus, dan dilakukannya sub kultur berulang kali untuk mendapatkan embrio somatik dalam jumlah banyak. Abnormalitas pembuahan pada tanaman kelapa sawit asal kultur jaringan dikenal dengan istilah *mantled*, yaitu mesokarp tidak berkembang. Dapat juga terjadi bunga jantan steril (Corley *et al.*, 1986). Abnormalitas terjadi pada rata-rata 5-10 % dari populasi bibit asal kultur jaringan (Jaligot *et al.*, 2000), dan bersifat epigenetik (Tregear *et al.*, 2002). Marmey *et al.* (1991) menyatakan bahwa kalus remah yang disebut sebagai kalus sekunder menyebabkan terjadinya kalus embrioid yang abnormal. Menurut Jones (1991) abnormalitas yang terjadi pada klon kelapa sawit hasil kultur jaringan disebabkan terhambatnya ekspresi gen yang mengatur pembungaan, sebagai akibat penambahan zat pengatur tumbuh tertentu ke dalam media.

Untuk mengembangkan teknik kultur jaringan sebagai alat perbanyakan klonal kelapa sawit, diperlukan suatu teknik yang mampu mendeteksi abnormalitas secara dini di antaranya pada tingkat molekuler atau DNA. Haris & Darussamin (1997) dan Toruan-Mathius *et al.* (2001) melaporkan bahwa RAPD mampu membedakan antar genotip normal, abnormal dan berbunga jantan dalam klon yang sama, namun tidak menemukan pita DNA pembeda abnormalitas yang dapat digunakan untuk semua

klon. Oleh sebab itu perlu digunakan teknik yang lebih sensitif untuk meng-hasilkan polimorfis antar genotip, salah satu di antaranya adalah AFLP.

AFLP merupakan kombinasi dari metode RAPD dengan RFLP yang dapat digunakan untuk menganalisis keragaman genetik melalui penggandaan fragmen DNA yang dihasilkan dari pemotongan enzim restriksi dengan menggunakan primer spesifik (Vos *et al.*, 1995; Maughn *et al.*, 1996). AFLP banyak digunakan di antaranya untuk mendeteksi sifat-sifat yang berhubungan erat dengan lokus suatu karakter tertentu, sidik jari DNA, keragaman genetik (Vandenmark, 1999), penelusuran pola segregasi (Singh & Cheah, 1996), penelusuran hasil mutasi, menetapkan jarak genetik dan mengidentifikasi keterpautan gen dengan resistensi penyakit (Scott *et al.*, 2000). AFLP memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan RAPD antara lain dapat diperoleh jumlah karakter yang lebih banyak karena jumlah pita DNA yang dihasilkan lebih banyak, amplifikasi DNA dapat bersifat spesifik dan lebih stabil (Vos *et al.*, 1995). Cabrita *et al.* (2001) menyatakan bahwa nisbah multipleks yang tinggi dari penanda AFLP membuat teknik ini dapat digunakan untuk mengenali hubungan kekerabatan yang sangat dekat antar-genotip, perbedaan antar klon dalam satu kultivar, keragaman yang disebabkan terjadinya mutasi yang sangat sedikit, atau adanya perbedaan genetik yang sangat kecil.

Tujuan penelitian ini adalah memanfaatkan teknik AFLP untuk mendapatkan pita DNA pembeda antar genotip normal, jantan mandul, dan buah abnormal dalam klon maupun antar klon kelapa sawit yang dihasilkan dari kultur jaringan.

## Bahan dan Metode

### *Bahan tanam*

Bahan tanaman kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga klon yaitu MK 152, MK 209, dan MK 212 yang masing-masing terdiri atas genotip berbuah normal, berbuah jantan mandul, dan berbuah abnormal sehingga yang dianalisis sebanyak sembilan genotip. Bahan tanam tersebut merupakan koleksi kebun percobaan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), di Ciampea yang berumur lima tahun. Dalam percobaan menyeleksi primer yang polimorfis digunakan DNA genom dari klon MK 152, genotip yang normal dan abnormal (Tabel 1).

DNA diisolasi dari bagian daun yang masih muda (daun tombak pada bagian pucuk) menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang telah dimodifikasi oleh Toruan-Mathius *et al.* (1997). Sebanyak 0,75 g daun muda dari sembilan genotip tanaman kelapa sawit digerus dalam lumpang porselin dengan menambahkan nitrogen cair. Untuk mencegah pencokelatan jaringan akibat oksidasi fenol, ke dalam lumpang berisi contoh ditambahkan polivinil poli pirilidon (PVPP) sebanyak 40 mg. Contoh diekstraksi menggunakan bufer ekstrak, sedang pemurnian menggunakan larutan kloroform : isoamil alkohol (24:1 v/v), dilakukan sebanyak dua kali. Larutan berisi DNA diendapkan dengan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 x g selama 10 menit pada suhu 4°C, selanjutnya supernatan dibuang. Endapan berupa pelet DNA dicuci menggunakan alkohol 70% dan dikeringanginkan. DNA yang didapat dilarutkan dalam 500 µL bufer TE dan

diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam setelah ditambahkan 20 µL RNase (10 mg/mL). DNA contoh dipresipitasi dengan menambah dua volume 100% alkohol dan 0,1 volume Na asetat 3 M pH 5,2 dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 x g pada suhu 4°C. Contoh DNA dikeringkan dengan 0,75 mL 70% alkohol serta diresuspensi dalam bufer TE dan disimpan pada suhu -20°C.

Kuantitas DNA ditetapkan secara elektroforesis 1,4% agarosa (Sambrook *et al.*, 1998). Sedang kualitas DNA diuji dengan melakukan restriksi menggunakan *EcoRI* dan selanjutnya difraksinasi pada 1,2% gel agarosa. Kualitas DNA total dapat dilihat dari hasil elektroforesis, kualitas DNA dikategorikan baik apabila terpotong oleh enzim *EcoRI* yang menghasilkan pola yang *smear*. Sedang kualitas DNA yang tidak terpotong dengan enzim *EcoRI* akan tetap utuh (Peterson *et al.*, 1993).

### *Analisis Polimorfisme DNA dengan AFLP*

Analisis DNA dengan teknik AFLP dilakukan menurut prosedur dari *Gibco BRL AFLP analysis system I* (Cat. No. 10544) dengan modifikasi tanpa pelabelan primer. Tahapan pelaksanaan penelitian mencakup (i) amplifikasi selektif, (ii) ligasi, (iii) pre-amplifikasi, dan (iv) amplifikasi selektif. Pada penelitian ini digunakan 20 pasang primer selektif (Tabel 1), yang selanjutnya dipilih sebanyak 10 pasangan primer selektif yang dapat menghasilkan pita DNA yang tegas dalam jumlah yang banyak.

DNA genom sebanyak 250 ng direstriksi dengan 2 µL *EcoRI/MseI* (1,25 unit/µL) dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan inaktivasi dilakukan pada suhu 70°C selama 15 menit. Digesti DNA

*Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit...*

Tabel 1. Pasangan primer yang digunakan untuk menyeleksi primer AFLP untuk mendapatkan pita polimorfis terbanyak.

*Table 1. Selective primer pairs used in primer AFLP selection to find highly polymorphic bands.*

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

Adaptor AFLP terdiri atas satu sekuens enzim spesifik, yaitu:

Struktur adaptor *EcoRI* : 5'CTCGTAGACTGCGTACC  
CATCTGACGCATGGTTAA3'

Struktur adaptor *MseI* : 5'GACGATGAGTCCTGAGT  
ACTCAGGACTCAT3'

genom dilakukan dalam tabung 0,5 mL Eppendorf, ke dalamnya dipipet sebanyak 5 µL 5 x bufer reaksi 2,5 µL DNA tomat sebagai kontrol (100 ng/µL), 2 µL *EcoRI/MseI* (1,25 unit/µL) dan 15,5 µL air destilasi sehingga total volume tabung 25 µL. Untuk DNA contoh masing-masing ke dalam tabung dimasukkan 5 µL 5 x bufer reaksi, 1 µL DNA contoh, 2 µL *EcoRI/MseI* dan 17 µL air destilasi berulang sehingga total volume 25µL, kemudian dicampur sampai homogen dan diinkubasi selama dua jam.

Reaksi ligasi adaptor dalam tabung digesti DNA genom di atas ditambahkan 24 µL larutan ligasi adaptor dan 1µLT4 DNA ligasi, dicampur dan diinkubasi pada suhu 20°C selama dua jam. Setelah itu dilakukan pengenceran 1:10 (v/v) terhadap hasil ligasi

dengan cara 10µL hasil reaksi dipindahkan ke tabung lain dan ditambah 90µL TE, kemudian dicampur sampai homogen.

*Reaksi preamplifikasi*

Ke dalam tabung Eppendorf 0,5 mL ditambahkan 5µL DNA cetakan yang telah diencerkan, 40µL pre-amplifikasi primer mix, 5µL 10X PCR bufer, 1 µL *Taq* DNA polimerase (1 unit/µL) sehingga total volume menjadi 51 µL. PCR dilakukan sebanyak 20 siklus pada 94°C selama 30 detik (denaturasi), 56°C selama 60 detik (anealing), 72°C selama 60 detik (ekstensi). Hasil PCR kemudian diencerkan 1:50 (v/v) dengan cara 3 µL hasil PCR dicampur dengan 147 µL bufer TE dalam tabung Eppendorf.

#### *Reaksi amplifikasi selektif*

Masing-masing primer *EcoRI* sebanyak 5  $\mu$ L dicampur dengan 45  $\mu$ L *MseI* yang selanjutnya diberi label mix 1. Ke dalam tabung Eppendorf dimasukkan 79  $\mu$ L air destilasi berulang, 20  $\mu$ L 10 x PCR bufer + Mg dan 1  $\mu$ L *Taq* polimerase (5 unit/ $\mu$ L) hingga volume total 100  $\mu$ L, campuran ini diberi label mix 2. Untuk setiap reaksi amplifikasi selektif dilakukan dengan menambahkan 5  $\mu$ L DNA cetakan sekunder hasil pre amplifikasi yang telah diencerkan, 5  $\mu$ L mix dan 10  $\mu$ L mix 2 sehingga total volume 20  $\mu$ L. Selanjutnya dilakukan reaksi amplifikasi menggunakan alat Thermolyne Amplitron I dengan kondisi menurut *GibcoBRL-Life Technology*. Hasil amplifikasi kemudian difraksinasi pada gel poliakrilamida yang terdiri atas 30% akrilamida : bis (29:1 vol/vol) sebanyak 2,0 mL, 4,2 g urea, 4,3 mL: H<sub>2</sub>O bebas ion, 0,5 mL 10 x bufer TE. Kemudian ditambahkan 67  $\mu$ L 10% larutan amonium peroksodisulfat (APS) dan 6,7  $\mu$ L TEMED dan dicampur secara perlahan serta dituang dalam cetakan yang telah disiapkan. Gel didiamkan secara perlahan dan dituangkan ke dalam cetakan yang sudah disiapkan. Gel didiamkan selama satu jam agar terjadi polimerisasi. Kemudian dilakukan pre amplifikasi dengan mengatur suhu permukaan gel pada 50°C.

Hasil preamplifikasi selektif disiapkan dengan mencampurkan setiap 5  $\mu$ L contoh dengan 5  $\mu$ L 2x *formamide dye loading solution* (90% formamid; 10 mM EDTA pH 8,0; 0,05% bromo fenol biru dan 0,05% silen sianol). Campuran tersebut disentrifugasi kemudian didenaturasi pada suhu 95°C selama tiga menit dan segera dimasukkan dalam es. Untuk masing-masing

sumur diisi dengan 10  $\mu$ L contoh dan dielektroforesis.

Pewarnaan gel poliakrilamida dengan perak nitrat menggunakan metode Promega. Larutan fiksasi (25 mL asam asetat glasial dan 225 mL H<sub>2</sub>O), larutan pewarnaan (0,1 g perak nitrat, 150  $\mu$ L 37% formaldehid dan 100 mL ddH<sub>2</sub>O). Tahapan pewarnaan selanjutnya adalah melepas gel dari cetakan, ditempatkan dalam wadah plastik ukuran 20x20 cm, dan ditambahkan larutan fiksasi sambil digoyang perlahan selama 20 menit kemudian dicuci dengan air bebas ion. Untuk memunculkan pita-pita DNA, gel direndam dalam larutan *developer* selama 20 menit dan difiksasi untuk mengawetkan pewarnaan.

#### *Analisis data*

Analisis data dari hasil AFLP dilakukan menggunakan analisis gerombol dengan teknik berhierarki menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.10 (NTSYS) (Rohlf, 1993). Selanjutnya pengelompokan tersebut ditampilkan dalam bentuk dendrogram (Franco *et al.*, 1997). Ukuran derajat kemiripan genetik antar genotip berdasarkan koefisien kemiripan genetik atau jarak genetik dengan menggunakan metode *Unweight Pair Group Method Arithmetic* (UPGMA). Fragmen yang dihasilkan dari analisis AFLP yang tampak sebagai pita DNA diterjemahkan menjadi data biner berdasarkan ada atau tidaknya pita yang dimiliki secara bersama oleh individu tanaman yang dianalisis. Nilai satu (1) diberikan untuk yang memiliki pita dan nilai nol (0) untuk yang tidak memiliki pita.

Estimasi kemiripan genetik diperoleh berdasarkan jumlah pita yang dimiliki

### *Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit...*

bersama. Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode UPGMA, fungsi *Similarity Qualitative* (SIMQUAL) pada program NTSYS versi 2.1 (Rohlf, 1993). Tingkat kepercayaan dari dendrogram berdasarkan UPGMA ditentukan melalui analisis *bootstrap* menggunakan program *Winboot* dengan pengulangan sebanyak 200 kali. Data matriks kemiripan genetik dihitung dari koefisien Dice (S) (Nei, 1987). Apabila jarak genetik antar genotip cukup dekat dilihat dari koefisien kemiripan genetik yang tinggi, analisis dilanjutkan dengan analisis komponen utama (AKU) untuk mendapatkan nilai skor yang dapat digunakan melihat posisi relatif setiap genotip berdasarkan tiga komponen utama pertama yang memiliki proporsi varians yang terbesar.

Untuk menentukan pita DNA yang paling berperan dalam pengelompokan klon-klon kelapa sawit yang normal dan abnormal, matriks tersebut dianalisis lebih lanjut berdasarkan *Principal Component* yang diturunkan dari matriks varians-kovarians.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Seleksi primer*

Dari 20 primer AFLP yang diuji, 10 primer mampu memberikan pita DNA yang bersifat polimorfik dengan jumlah pita berkisar dari 16 sampai 33. Total pita yang dihasilkan adalah 264, dan 49 di antaranya adalah pita DNA yang polimorfik. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa delapan primer selektif AFLP dapat membedakan genotip jantan, normal, dan abnormal untuk klon-klon tertentu, yaitu *EcoRI* ACT/*MseI* +

CAA, *EcoRI* AAG/*MseI* + CAG, *EcoRI* AGG/*MseI* + CAA, *EcoRI* AGG/*MseI* + CTA, *EcoRI* AGC/*MseI* + CAG, *EcoRI* ACG/*MseI* + CAT (Tabel 2). Tampak bahwa pasangan basa pita-pita DNA pembeda sangat ragam untuk masing-masing primer. Tidak ditemukan pita pembeda yang spesifik (bp yang sama) atau polimorfisme tunggal yang mampu membedakan antar genotip normal, abnormal, atau berbunga jantan steril yang dapat digunakan sebagai pembeda secara universal.

Matthes *et al.* (2001) menggunakan 10 kombinasi primer AFLP untuk mengamplifikasi ortet dan beberapa tanaman hasil kultur jaringan yang berbunga dan berbuah normal dan abnormal, menghasilkan 264 pita DNA dan 95 pita DNA yang bersifat polimorfik. Phillips *et al.* (1994) mengemukakan bahwa tanaman yang beregenerasi dari kultur kalus yang relatif tidak terdiferensiasi menyebabkan kemungkinan terjadinya perubahan genetik yang sangat besar. Perubahan tersebut mencakup perubahan dalam pengaturan kromosom dan mutasi gen tunggal umumnya yang resesif, metilasi DNA, dan fenomena mutasi titik yang berulang yang biasanya disebut sebagai kesalahan pengaturan yang mempengaruhi premitotik. Dilaporkan juga bahwa berbagai tipe mutasi yang berhubungan dengan kultur jaringan merupakan faktor yang berperan dalam berbagai perubahan fenotipik. Perubahan tersebut mencakup aberasi kromosom yang disebabkan oleh patahnya ikatan kromosom, pertukaran basa tunggal, perubahan dalam jumlah kopi urutan basa yang berurutan, dan perubahan dalam pola metilasi DNA. Perubahan-perubahan tersebut disebabkan antara lain oleh lingkungan kultur seperti media tumbuh atau eksplan yang digunakan yang dapat meng-

Tabel 2. Pasangan primer yang mampu menghasilkan pita-pita DNA pembeda antar genotip jantan steril, normal, dan abnormal pada klon-klon yang diamati.

Table 2. Selective primer pairs that have the ability to produce DNA bands to differentiate among male sterile, normal, and abnormal genotypes clones were tested.

No.	Pasangan primer <i>Pairs primer</i>	Genotip klon yang dapat dibedakan <i>Clone genotype that can be differentiated</i>
1.	<i>EcoRI</i> ACT/ <i>MseI</i> +CAA	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
2.	<i>EcoRI</i> AAG/ <i>MseI</i> +CAC	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
3.	<i>EcoRI</i> ACA/ <i>MseI</i> +CAG	209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
4.	<i>EcoRI</i> ACC/ <i>MseI</i> +CTA	152J, 152N,152Ab
5.	<i>EcoRI</i> ACC/ <i>MseI</i> +CAC	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
6.	<i>EcoRI</i> AGG/ <i>MseI</i> +CAA	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
7.	<i>EcoRI</i> AGG/ <i>MseI</i> +CTA	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
8.	<i>EcoRI</i> AGC/ <i>MseI</i> +CAA	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
9.	<i>EcoRI</i> AGC/ <i>MseI</i> +CAA	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N
10.	<i>EcoRI</i> AGC/ <i>MseI</i> +CAG	152J, 152N,152Ab,209J, 209N,209Ab,212Ab & 212N

Keterangan : J- jantan steril; N-normal; Ab-abnormal

Note : J- male sterile; N- normal; Ab-abnormal

akibatkan berbagai perubahan genomik dalam proses selular yang akan menyebabkan abnormalitas.

Untuk menginduksi pembentukan dan perbanyakkan kalus, eksplan daun muda tanaman kelapa sawit dikulturkan dalam medium Murashige & Skoog (1962) dengan penambahan 2,4-D dengan konsentrasi yang cukup tinggi (80-100 mg/L) (Wong *et al.*, 1999). Karp (1995) melaporkan bahwa variasi somaklonal juga dipengaruhi jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium. Auksin sintetik 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh yang mampu meningkatkan frekuensi terjadinya mutasi dalam sel. Corley *et al.* (1986) melaporkan bahwa penampakan deformasi pertumbuhan vegetatif dan keragaman dalam rangkaian bunga klon-klon kelapa sawit yang diper-

banyak melalui kultur jaringan adalah akibat penambahan 2,4-D dalam medium induksi kalus.

#### *Analisis kemiripan genetik berdasarkan DNA-AFLP*

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat kemiripan genetik antara genotip dalam satu klon maupun antar klon cukup tinggi, yaitu antara 0,92-0,99 yang berarti 92-99% karakter genetiknya adalah sama (Tabel 3). Tingginya tingkat kemiripan genetik menunjukkan bahwa perubahan pita DNA antar genotip dalam satu klon dan antar klon yang berbeda sangat sedikit yaitu 1-8%. Dapat disimpulkan bahwa perubahan DNA yang sangat tidak nyata mampu menyebabkan perubahan fenotipik yang cukup besar, khususnya dalam organ reproduktif tanaman kelapa sawit.

*Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit...*

Tabel 2. Matriks kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA hasil amplifikasi dari 10 pasang primer selektif AFLP.

Table 2. Matrix of genetic similarity based on DNA bands pattern from the amplification of 10 selective AFLP primer pairs .

	152J	152Ab	152N	209J	209Ab	209N	212J	212Ab	212N
152J	1,00								
152Ab	0,96	1,00							
152N	0,94	0,94	1,00						
209J	0,96	0,95	0,95	1,00					
209Ab	0,94	0,97	0,95	0,98	1,00				
209N	0,92	0,94	0,99	0,96	0,96	1,00			
212J	0,96	0,94	0,96	0,96	0,94	0,95	1,00		
212Ab	0,94	0,95	0,96	0,94	0,97	0,95	0,97	1,00	
212N	0,93	0,94	0,99	0,94	0,95	0,98	0,97	0,97	1,00

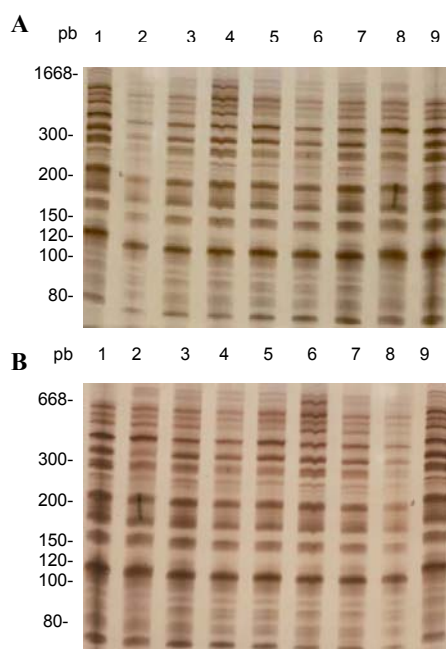
*Analisis pengelompokan UPGMA*

Hasil pengelompokan berdasarkan UPGMA menunjukkan bahwa seluruh genotip yang diuji mengelompok menjadi dua pada tingkat kemiripan genetik 95%. Kelompok I terbagi atas sub kelompok genotip abnormal dari klon MK152 jantan steril, M152 abnormal serta sub sub kelompok MK 209 (jantan steril dan abnormal pada 97,4% kemiripan genetik. Kelompok II, terbagi atas sub kelompok MK152 normal dan MK209 normal, serta MK212 normal. Sub kelompok lainnya adalah MK212 abnormal. Kelompok II terpisah menjadi dua sub kelompok pada tingkat kemiripan 96% yaitu MK152, MK209, dan MK212 normal serta MK212 abnormal. Tampak bahwa klon MK152 normal dan MK209 normal mempunyai tingkat kemiripan genetik 99% (Gambar 2).

Hasil pengelompokan berdasarkan komponen utama satu (KU-1), dengan komponen utama dua (KU-2) dan komponen utama tiga (KU-3) menunjukkan

terjadinya pengelompokan klon kelapa sawit yang berbuah normal (Gambar 3). Tampak bahwa pengelompokan yang diperoleh dari analisis komponen utama mendukung pengelompokan berdasarkan UPGMA. Secara keseluruhan dari data yang diperoleh menunjukkan bahwa perbedaan pita DNA antar genotipe dalam satu klon maupun antar klon, sangat rendah. Namun ekspresi gen dari perubahan tersebut memberikan implikasi yang cukup besar pada perubahan fenotipiknya.

Harding (1994) menemukan dalam kultur jaringan kentang dengan penambahan zat pengatur tumbuh yang bersifat retardan dapat menyebabkan terjadinya perubahan morfologi pada planlet hasil perbanyakan dengan kultur jaringan. Hal tersebut erat kaitannya dengan perubahan pada ekspresi gen. Mathes *et al.* (2001) dengan teknik AFLP standar dan AFLP menggunakan enzim yang sensitif terhadap metilasi menunjukkan bahwa dengan AFLP standar tidak diperoleh polimorfis, sedangkan dengan AFLP enzim sensitif metilasi



Gambar 1. Pola pita DNA sembilan genotipe kelapa sawit yang diuji, hasil amplifikasi dengan primer (A) *EcoRI* + *ACT/MseI* + *CAA* dan (B) *EcoRI* + *ACA/MseI* + *CAG*. (1) : MK152 jantan steril; (2) MK152 abnormal; (3) MK152 normal; (4) MK209 jantan steril; (5) MK209 abnormal; (6) MK209 normal; (7) MK212 jantan steril; (8) MK212 abnormal; (9) MK212 normal.

Figure 1. DNA bands pattern of nine genotypes of oil palm tested, amplification results with primer (A) *EcoRI* + *ACT/MseI* + *CAA* and (B) *EcoRI* + *ACA/MseI* + *CAG*. (1) MK152 sterile male; (2) MK152 abnormal; (3) MK152 normal; (4) MK209 sterile male; (5) MK209 abnormal; (6) MK209 normal; (7) MK212 sterile male; (8) MK212 abnormal; (9) MK212 normal.

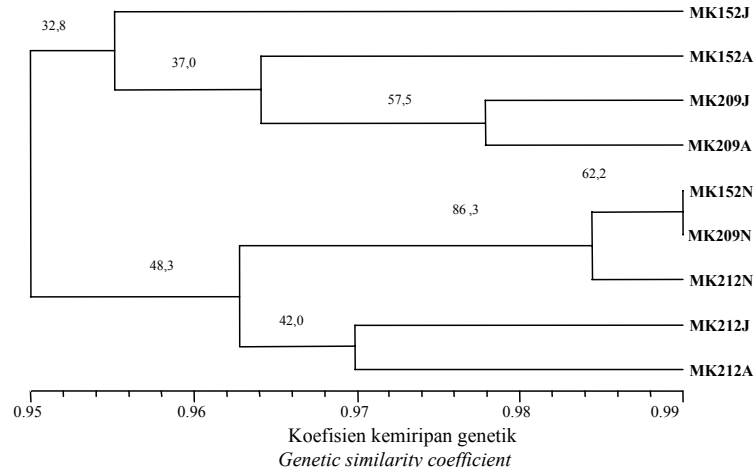
diperoleh polimorfis antar ramet yang menunjukkan terjadinya reduksi metilasi DNA selama dalam proses kultur. Variasi somaklonal yang terjadi pada bibit klonal kelapa sawit diduga berhubungan erat dengan perubahan pola metilasi DNA selama dalam kultur (Phillips *et al.*, 1994; Jaligot *et al.*, 2000).

Matthes *et al.* (2001) menyatakan bahwa adanya korelasi yang nyata antara hipometilasi dengan variasi somaklonal pembungaan *mantled* pada bibit kelapa sawit asal kultur jaringan. Menurut Kaepler *et al.* (2000) adanya hubungan antara hipermetilasi dari residu sitosin DNA yang dekat atau berada dalam gen atau promotor gen dan menekan ekspresi gen. Grandbastein (1998) mengemukakan bahwa akibat dari terjadinya metilasi secara konsisten menunjukkan tipe dari ekspresi gen pada abnormalitas pembungaan tanaman kelapa sawit setelah beberapa tahun di lapang.

Fraga & Esteller (2002) dan Rein *et al.* (1998) menyatakan bahwa metilasi sitosin pada posisi lima dari cincin pirimidin merupakan epigenetik yang sangat penting pada tanaman, metil sitosin umumnya ditemukan pada sitosin yang terikat pada basa guanin dengan urutan basa trinukleotida (C<sub>p</sub>N<sub>p</sub>G). Ehrlich & Ehrlich (1998) mengemukakan bahwa adanya 5-metilsitosin pada promotor gen spesifik akan mengubah pelekatan faktor transkripsional dan protein lainnya pada DNA. Di samping itu dapat juga terjadi penarikan metil-DNA-binding protein dan histon deasetilase yang akan mengubah struktur kromatin di sekitar daerah awal transkripsi pada gen. Kedua mekanisme tersebut memblokir transkripsi dan menyebabkan gen *silencing*.

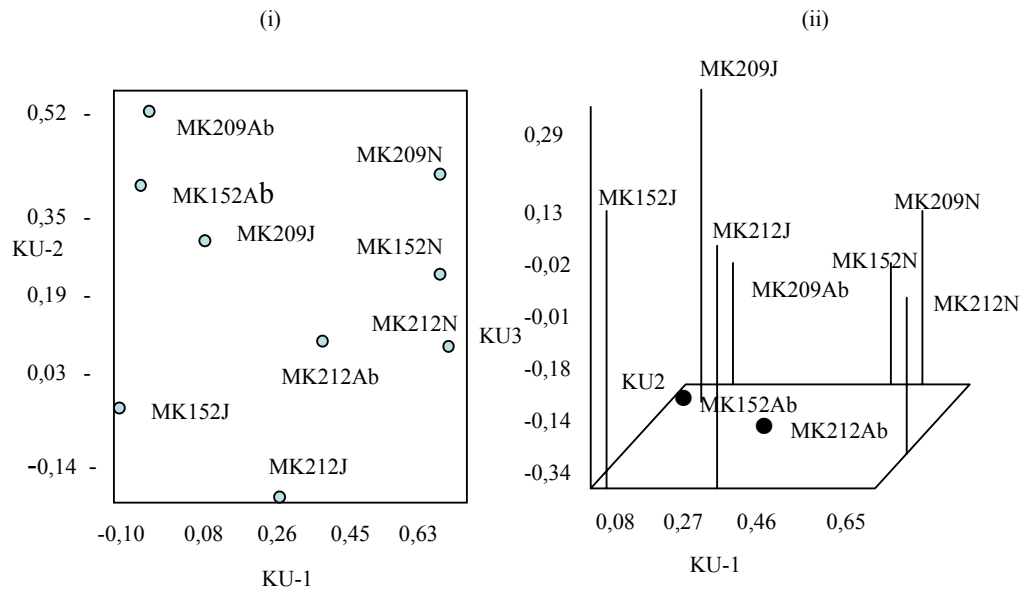
Wolffe *et al.* (1999) menyatakan bahwa residu metilasi C dalam DNA genomik memegang peranan dalam regulasi ekspresi

*Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit....*



Gambar 2. Dendrogram UPGMA berdasarkan pita DNA-AFLP dari klon MK 152, MK 209, dan MK212.

Figure 2. Dendrogram UPGMA based on DNA- AFLP bands from MK 152, MK209, and MK 212 clones.



Gambar 3. (i) Pemetaan KU-1 dan KU2; (ii) Pemetaan KU-1, KU-2, dan KU-3 klon MK152, MK209, dan MK212 masing-masing terdiri atas genotip normal, berbunga jantan, dan berbuah abnormal.

Figure 3. (i) PCA-1, and PCA-2; (ii) PCA-1, PCA-2, and PCA-3 of MK152, MK209, and MK212, are normal, flower male sterile, and abnormal fruits genotypes, respectively.

gen. Matthes *et al.* (2001) dan Portis *et al.* (2004) menggunakan teknik AFLP yang dimodifikasi menggunakan isozisomer enzim *MseI*/*PstII* MSAP (*methylation-sensitive amplified polymorphism*) untuk mendeteksi metilasi DNA klon-klon tanaman kelapa sawit dan lada. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa untuk mendapatkan pembeda antar genotipe normal dan abnormal dalam satu klon maupun antar klon, perlu digunakan teknik analisis molekuler yang lebih sensitif.

### Kesimpulan

Pasangan primer selektif AFLP yang menghasilkan pita DNA yang mampu membedakan genotip jantan, normal dan abnormal dalam klon kelapa sawit yang sama, 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.

Tidak ditemukan primer selektif dan pita DNA-AFLP spesifik yang mampu membedakan antara genotip normal, jantan, dan abnormal untuk semua klon kelapa sawit.

### Daftar Pustaka

- Cabrita, L. F., U. Aksoy, S. Hepaksoy, J. Leitao (2001). Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Sci. Hort.*, **87**, 261-273.
- Corley, R.H.V., C.H. Lee, I.H. Law & C.Y. Wong (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter*, **62**, 233-240.
- Direktorat Jendral Perkebunan (2004). Pertemuan Produsen dan Konsumen Benih Kelapa Sawit Tahun 2004. Bogor, 27 September 2004.
- Ehrlich, M. & K.C. Ehrlich (1998). Effect of DNA methylation on the binding of vertebrate and plant proteins to DNA. *EXS.*, **64**, 145-168.
- Fraga, M.F. & M. Esteller (2002). DNA methylation: A profile of methods and applications. *BioTechniques*, **33**, 632-649.
- Franco, J., J. Crosa, J. Vilasenor, S. Taba & B.A. Eberhart (1997). Classifying mexican maize accession using hierarchical and density search methods. *Crop Sci.*, **37**, 972-980.
- Gibco BRL AFLP analysis system I (Cat. No. 10544
- Grandbastein, M.A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci.*, **3**, 181-187.
- Harding, K. (1994). The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **37**, 31-38.
- Haris, N. & A. Darussamin (1997). RAPD analysis of oil palm clones with normal and abnormal fruits. *Menara Perkebunan*, **65**(2), 64-74.
- Jaligot E., A. Rival, T. Beule, S. Dussert & J.L. Verdeil (2000). Somaclonal

*Analisis genotip normal dan abnormal pada klon kelapa sawit...*

- variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Rep.*, **19** (7), 684 - 690.
- Jones, L. H (1991). Endogeneous cytokinins in oil palm (*Elaeis guineensis* L.) callus, embryoids and regenerant plants measured by radioimmunoassay. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **20**,201-210.
- Kaeppler, S.M., H.F. Kaeppler & Y. Rhee (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.*, **43**,179-188.
- Karp, A. (1995). On the current somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphitica*, **85**, 295-302
- Maughan, P.J., M.A. Saghai Maroof, G.R. Buss & G.M. Huestis (1996). Amplified Length Polymorphism (AFLP) in soybean; species diversity, inheritance, and nearisogenic line analysis. *Theor Appl. Genet.*, **93**,392-401.
- Marmey, P., I. Besse & J. Verdeil (1991). A proteic markers found to differentiate two types of calli of the same clones of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **313**, 333-338.
- Matthes M., R.Singh, S.C. Cheah & A. Karp (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.*, **102**, 971-979.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**,473-497.
- Nei, M. (1987). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genet.*, **89**,583-590.
- Orozco-Castillo C., K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **87**,934-940.
- Peterson, A.H., C.L. Brubajer & J.F. Wenel (1993). A rapid method for extraction of cotton (*Gosypium spp.*) genomic suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol. Biol.*, **11** (2),122-127.
- Phillips R. L., D. J. Plunkett & S.M. Kaeppler (1994). Do we understand somaclonal variation? In H.J.J. Nijkamp *et al.* (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proc. 7<sup>th</sup> Int. Cong. Plant Tiss. Cell Cult.*, p.131 - 141.
- Portis E. A. Acquadro, C. Comino & S. Lanteri (2004). Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.*, **16**, 169 - 178.
- Rein, T., D.A. Natale, M.L. Depamphilis & H. Zorbas (1998). Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nuc. Acids Res.*, **26**, 2255-2264.

- Rohlf, F.J. (1993). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.10. New York.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1998). *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Lab. CSH
- Scott, K.D., E.M. Ablett, L.S. Lee & R.J. Henry (2000). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame seedless grape. *Euphytica*, **113**, 245-249.
- Singh, R. & C.S. Cheah (1996). Flower: specific gene expression in oil palm revealed by differential display. *In Proc. 1996 Porim Int. Palm Oil Congress*, Kuala Lumpur, 23-28 September 1996.
- Toruan-Mathius, N. & T. Hutabarat (1997) mikropopulasi kopi arabika (*Coffea Arabica* L.) melalui embriogenesis somatic dan analisis kestabilan genetiknya dengan RAPD. *Dalam Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia*, Surabaya, 12-14 Maret 1997. p. 105-110.
- Toruan-Mathius, N., S.I.I. Bangun & Maria-Bintang (2002). Analisis abnormalitas tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) hasil kultur jaringan dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *Menara Perkebunan*, **69**(2), 58-70.
- Tregear, J., F. Morcillo, F. Richaud, A. Berger, R. Singh, S.C. Cheah, C. Hartmann, A. Rival & Y. Duval (2002). Characterization of a difensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variations events. *J. Expt. Bot.*, **53**(373), 1387-1396.
- Vandermark, G.J. (1999). Detection of polymorphism in fungi using the AFLP technique and agarose gels. *Focus*, **21**, 26-30.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nuc. Acids Res.*, **23**, 4407 - 4414.
- Wolffe, A.P., P.L. Jones & P.A. Wade (1999). DNA methylation. *In Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5894-5896.
- Wong, G., S.P. Chong, C.C. Tan & A.C. Soh (1999). Liquid suspension culture. A potential technique for mass production of oil palm clones. *Palm Oil Research Institute of Malaysia*. p. 3-10