

Analisis Keragaman Genetik DNA Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Menggunakan Primer Spesifik untuk Beta Karoten

*Genetic diversity analysis of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) DNA using specific primer for beta carotene*

Alexander M. Luthfi, Lollie Agustina P. Putri*, Revandy Iskandar M. Damanik

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan 20155

*Corresponding author: lolliie_agustina@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of the research was to analyze genetic diversity of oil palm DNA by using specific primer for beta carotene. This research was conducted in Plant Tissue Culture Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Sumatera Utara and Bio Molecular Laboratory of SSPL (Socfindo Seed Production and Laboratories) Bangun Bandar, Dolok Masihul, Serdang Bedagai-Sumatera Utara, from February to August 2016. A total of 38 oil palm DNA stock samples issued by PT. Socfin Indonesia was identified using specific Beta primer of molecular marker for beta carotene. The results showed analysis of phylogenetic dendrogram using DARwin 6.0.13 spread 38 samples into three main groups.

Keywords: beta carotene, oil palm, polymerase chain reaction, spesific primer

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik DNA kelapa dengan menggunakan primer spesifik untuk beta karoten. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara dan Laboratorium Bio Molekuler SSPL (Socfindo Seed Production and Laboratories) Bangun Bandar, Dolok Masihul, Serdang Bedagai-Sumatera Utara, dimulai dari bulan Februari hingga Agustus 2016. Sebanyak 38 sampel stok DNA dari tanaman kelapa sawit yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia diidentifikasi menggunakan marka molekuler primer spesifik Beta untuk karakter beta karoten. Hasil penelitian menunjukkan analisis filogenik dendrogram menggunakan DARwin 6.0.13 membagi 38 sampel menjadi tiga kelompok utama.

Kata kunci: beta karoten, kelapa sawit, polymerase chain reaction, primer spesifik

PENDAHULUAN

Kelapa sawit adalah penghasil minyak nabati terbesar di dunia karena minyaknya dapat diproduksi baik dari serabut buah maupun inti. Minyak tersebut digunakan sebagai minyak masak, minyak industri, maupun bahan bakar (biodiesel). Keunggulannya yang lain diantaranya sifatnya yang tahan oksidasi dengan tekanan

tinggi, kemampuannya melarutkan bahan kimia yang tidak larut oleh bahan pelarut lainnya, dan daya melapis yang tinggi membuatnya dapat digunakan untuk berbagai macam keperluan (Kementerian Perdagangan, 2013).

Peningkatan perhatian konsumen minyak nabati akan nilai nutrisi dan kesehatan menjadi tuntutan permintaan masyarakat saat ini. Kelapa sawit adalah

tanaman penghasil minyak nabati yang dapat diandalkan karena memiliki berbagai keunggulan dibandingkan dengan minyak yang dihasilkan oleh tanaman lain. Minyak kelapa sawit mengandung beta-karoten yang cukup tinggi, berkisar antara 500 - 700 ppm, yang terdiri dari 36 % alfa-karoten dan 54 % beta-karoten. Setiap satu ton minyak kelapa sawit mengandung lebih kurang 240 g karoten (Mangoensoekarjo dan Semangun, 2008) dan mengandung retinol 15 kali lebih banyak dari wortel, 300 kali lebih banyak dari tomat (Malaysian Palm Oil Board, 2003).

Karotenoid itu sendiri pada manusia berfungsi sebagai sumber vitamin A. Karotenoid diasosiasikan dengan berbagai macam kegunaannya untuk kesehatan, diantaranya sebagai antioksidan bagi tubuh, meningkatkan sistem imun, mengurangi resiko beberapa jenis kanker dan penyakit kardiovaskular, juga mengurangi resiko katarak (Olson, 1999).

Karakter kandungan beta karoten pada tanaman kelapa sawit memiliki nilai heritabilitas yang tinggi. Berdasarkan penelitian Putri (2010) didapati bahwa nilai duga heritabilitas arti luas karakter tersebut sebesar 84,8 %. Dari hal ini dapat disimpulkan bahwa karakter kandungan beta karoten pada tanaman kelapa sawit lebih banyak dipengaruhi oleh faktor genetik ketimbang faktor lingkungan.

Pemuliaan konvensional memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya waktu yang diperlukan untuk memasukkan gen-gen yang diinginkan dan jumlah genotipe yang harus ditangani pada saat awal-awal seleksi yang besar sehingga membutuhkan tenaga kerja dalam jumlah yang sangat besar. Oleh sebab itu, diperlukan penggunaan teknologi baru untuk membantu meringankan pekerjaan pemulia tanaman, salah satunya adalah penggunaan marka molekuler. Penggunaannya dapat mempersingkat waktu yang dibutuhkan dalam melakukan seleksi dan menentukan apakah gen yang

diinginkan benar-benar ada dalam tanaman terseleksi (Bahagiawati, 2011).

Usaha untuk memahami ataupun memodifikasi berbagai proses biologi pada tingkat molekuler, memerlukan tersedianya gen-gen yang terlibat di dalam proses tersebut termasuk informasi yang terkait dengan gen-gen tersebut. Untuk itu diperlukan adanya pelacak spesifik gen yang dapat mengidentifikasi keberadaannya maupun ekspresinya dengan cara yang mudah namun akurat. Ada beberapa pendekatan yang dapat digunakan untuk mengembangkan pelacak spesifik tersebut. Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR, saat ini merupakan salah satu cara yang relatif mudah yang dapat dilakukan (Santoso, 2001).

Penelitian menggunakan primer spesifik untuk mengidentifikasi gen-gen tertentu telah banyak dilakukan. Primer untuk lycopene β -cyclase berhasil dirancang berdasarkan daerah homologi gen pada beberapa spesies tanaman menggunakan akses internet dan dapat digunakan mengamplifikasi fragmen DNA kelapa sawit dengan menghasilkan satu atau lebih ampikon (pita). Desain PRIMER3 mampu menghasilkan primer spesifik Beta-F dan Beta-R dengan produk PCR sebesar 578 bp. Parsial fragmen gen target yang berperan dalam lintasan metabolisme yang menghasilkan beta karoten berhasil diisolasi dari kelapa sawit dalam bentuk genomik klon (Putri *et al.*, 2007).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik DNA tanaman kelapa sawit yang diisolasi dari beberapa individu menggunakan primer spesifik untuk beta karoten.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Sumatera

Utara Medan dan Laboratorium Bio Molekuler SSPL (Socfindo Seed Production and Laboratories) Bangun Bandar Desa Martebing Kecamatan Dolok Masihul Kabupaten Serdang Bedagai Sumatera Utara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2016 sampai bulan Agustus 2016.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel akar muda, 13 sampel daging buah muda, 19 sampel daun muda (daun tombak), 1 sampel pollen, dan 1 sampel bunga betina yang berasal dari tanaman kelapa sawit yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia, air, amplop coklat, plastik, aquades, ddH₂O, aluminium foil, *Polyvinylpolypyrrolidone* (PVPP) (*Promega*, 77627), nitrogen cair, buffer ekstraksi *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), β -*mercaptoethanol*, tabung *Eppendorf* (ukuran 2 ml dan 1,5 ml), tabung PCR 0,2 ml, Kloroform Isoamil Alkohol (KIAA), isopropanol, buffer TE, ethanol absolute, ethanol 70 %, larutan TBE 1x dan 0,5x, larutan TAE 1x, gel agarose (*Promega*, V3121), etidium bromida, es, nuclease free water, *loading dye*, *Benchtop 1kb DNA Ladder* (*Promega*, G7541), *Go Green Taq Master Mix* (*Promega*, M7122). Digunakan dua primer yaitu primer spesifik Beta yang terdiri dari primer Beta Forward (5'-CCA CTG GCT TCT CTA GGC-3') dan primer Beta Reverse (5'-CCT CTC TAT CGG CCA GAC-3') dan primer SSR-3574 sebagai primer pembanding.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kamera, mortar dan alu, *spatula*, mikropipet (*Eppendorf Research plus*), vorteks (*Biosan Basic Plus V-1*), rak *tube*, *waterbath*, *hotplate* dan *stirer* (*Biosan MSH-300*), *centrifuge* (*Tomy MX-Series*), kulkas, *freezer*, komputer, nanospektrometer (*Eppendorf Biospectrometer*), timbangan analitik, labu erlenmeyer, *microwave*, cetakan agarose, bak elektroforesis, *power supply*, *thermal cycler* (*Mastercycler nexus*), ditentukan dari perbedaan migrasi alel pada gel dari masing-masing sampel. Berdasarkan

UV Transilluminator dan *Gel documentation* (*UVITEC Cambridge 20 UV*).

Beberapa sampel yang diambil dari lapangan yang terdiri 19 sampel daun muda (daun tombak), 13 sampel buah muda (9 jenis *virescens* dan 4 jenis *nigrescens*), 4 sampel akar kecambah, 1 sampel pollen (serbuk sari), dan 1 sampel bunga betina tanaman kelapa sawit yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia. Kemudian isolasi DNA dilakukan dengan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi dengan penambahan *Polyvinylpolypyrrolidone* (PVPP) dan β -*mercaptoethanol*. Sebanyak 38 sampel stok DNA yang berhasil diisolasi kemudian diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose 2,0 % dan secara kuantitatif dengan nanospektrometer. Total keseluruhan sampel adalah 38 stok DNA.

Proses amplifikasi PCR seluruh sampel menggunakan *thermal cycler* dengan tahapan reaksi berdasarkan penelitian Putri *et al.* (2007) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Proses amplifikasi PCR

No.	Tahapan	Suhu	Waktu	Jumlah Siklus
1	Denaturasi awal	94°C	2 menit	1
2	Denaturasi	94°C	2 menit	30 - 35
3	<i>Annealing</i>	54°C	1 menit	30 - 35
4	<i>Extension</i>	72°C	1 menit	30 - 35
5	<i>Extension</i> akhir	72°C	10 menit	1
6	Kondisi akhir PCR	4°C	Tak terbatas	1

Hasil amplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarose 1,2 % selama 60 menit pada 75 volt kemudian divisualisasikan dengan *UV Transluminator*.

Untuk penentuan keragaman genetik, produk PCR diskoring berdasarkan muncul tidaknya pita. Pita yang muncul pada gel diasumsikan sebagai alel. Keragaman alel ada atau tidaknya pita, profil pita diterjemahkan ke dalam data biner. Pita

yang muncul diberi kode 1 (ada) dan 0 (tidak ada) (Ferreira dan Grattapaglia, 1998).

Data skoring kemudian diolah menggunakan software DARwin 6.0.13 (Perrier dan Jacquemoud-Collet, 2009) dimana matriks jarak atau ketidaksamaan genetik untuk semua kombinasi pasangan individu dapat dilakukan dengan *Neighbor-Joining Tree* (NJTree) untuk memperoleh

gambaran dari kekerabatan di antara individu-individu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identitas beberapa sampel yang diperoleh dari lapangan yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Identitas sampel yang dikeluarkan oleh PT. Socfin Indonesia

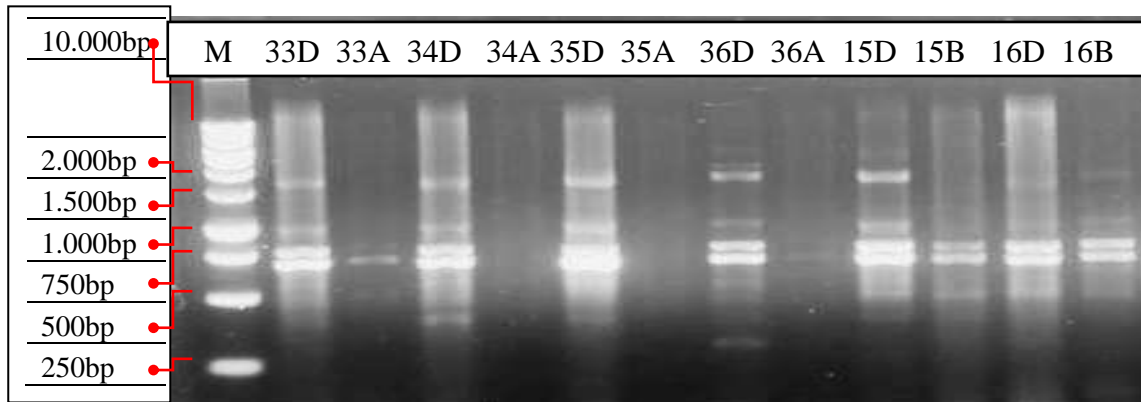
No. Individu	Origin	Jenis Buah	Tahun Tanam	Bentuk Sampel yang diisolasi
6	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Buah dan Daun
7	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Buah dan Daun
9	KAMERUN	<i>Virescens</i>	2009	Buah dan Daun
15	OLEIFERA HYBRID	<i>Nigrescens</i>	2008	Buah dan Daun
16	OLEIFERA HYBRID	<i>Nigrescens</i>	2008	Buah dan Daun
17	OLEIFERA HYBRID	<i>Nigrescens</i>	2008	Buah dan Daun
18	OLEIFERA HYBRID	<i>Nigrescens</i>	2008	Buah dan Daun
19	WA	<i>Virescens</i>	2005	Buah dan Daun
21	WA	<i>Virescens</i>	2005	Buah dan Daun
23	WA	<i>Virescens</i>	2005	Buah dan Daun
25	ANGOLA	<i>Virescens</i>	2012	Buah dan Daun
28	ANGOLA	<i>Virescens</i>	2012	Buah dan Daun
30	ANGOLA	<i>Virescens</i>	2012	Buah dan Daun
31	YANGAMBI	-	1998	Daun dan Pollen
32	DELI	-	1998	Bunga Betina dan Daun
33	LAME	-	2016	Akar dan Daun
34	LAME	-	2016	Akar dan Daun
35	LAME	-	2016	Akar dan Daun
36	LAME	-	2016	Akar dan Daun

Elektroforegram produk PCR pada Gambar 1 – 3 menunjukkan bahwa tiga sampel tidak dapat teramplifikasi menggunakan primer Beta. Tiga sampel tersebut adalah 34A, 35A, dan 36A. Terdapat satu sampel yang menampilkan pita yang tipis yaitu 19B. Perbandingan sampel dilakukan menggunakan primer

SSR-3574 yang teramplifikasi pada semua sampel. Hal ini diduga karena adanya senyawa-senyawa polisakarida dan metabolit sekunder yang masih tersisa pada DNA stok yang menurut pernyataan Wilkins dan Smart (1996) mengatakan senyawa-senyawa kontaminan yang dapat mengganggu reaksi PCR seperti polisakarida

dan metabolit sekunder. Struktur polisakarida yang mirip dengan asam nukleat akan menyebabkan polisakarida

tersebut akan mengendap bersama dengan asam nukleat.



Gambar 1. Profil elektroforegram produk PCR primer Beta pada beberapa sampel kelapa sawit

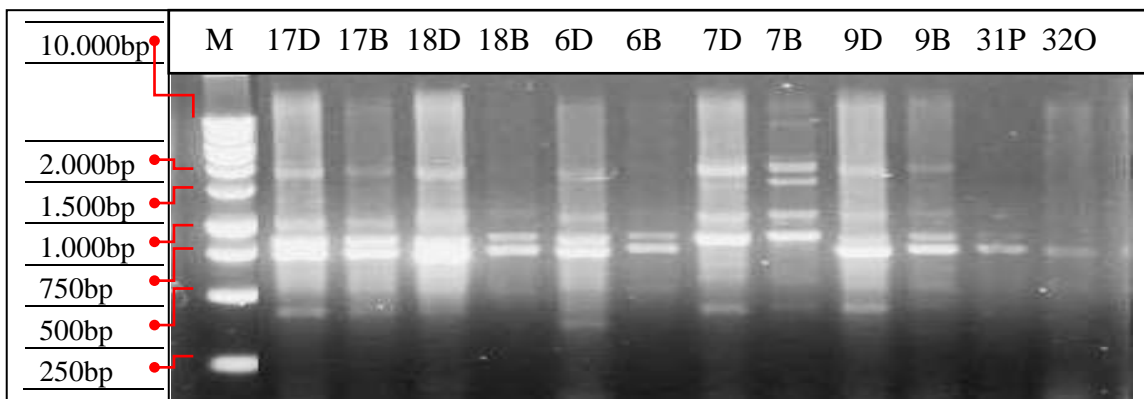
Keterangan:

M = DNA ladder 1kb (Marker)

A = isolasi DNA berasal dari bagian akar (33, 34, 35, 36)

D = isolasi DNA berasal dari bagian daun (15, 16, 33, 34, 35, 36)

B = isolasi DNA berasal dari bagian buah (15 dan 16)



Gambar 2. Profil elektroforegram produk PCR primer Beta pada beberapa sampel kelapa sawit

Keterangan:

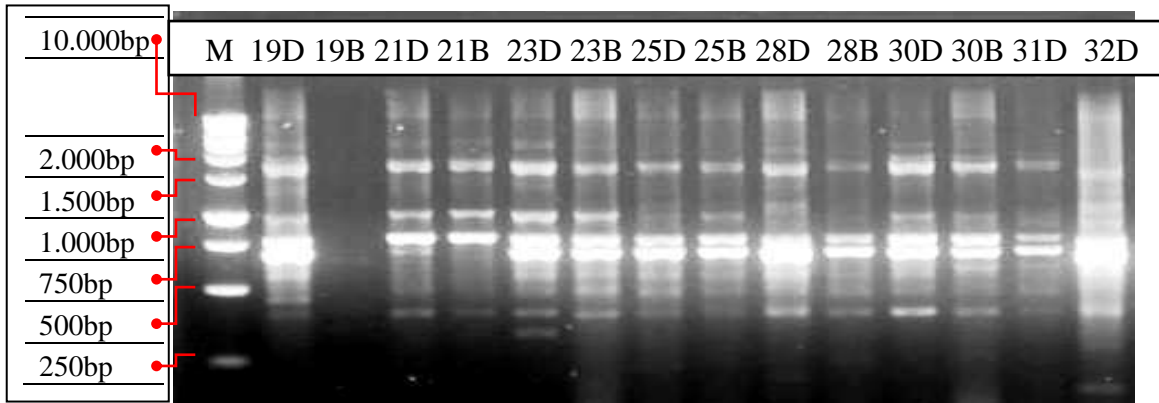
M = DNA ladder 1kb (Marker)

D = DNA stok berasal dari bagian daun (6, 7, 9, 17, 18)

B = DNA stok berasal dari bagian buah (6, 7, 9, 17, 18)

P = DNA stok berasal dari bagian pollen (31)

O = DNA stok berasal dari bagian bunga betina (32)



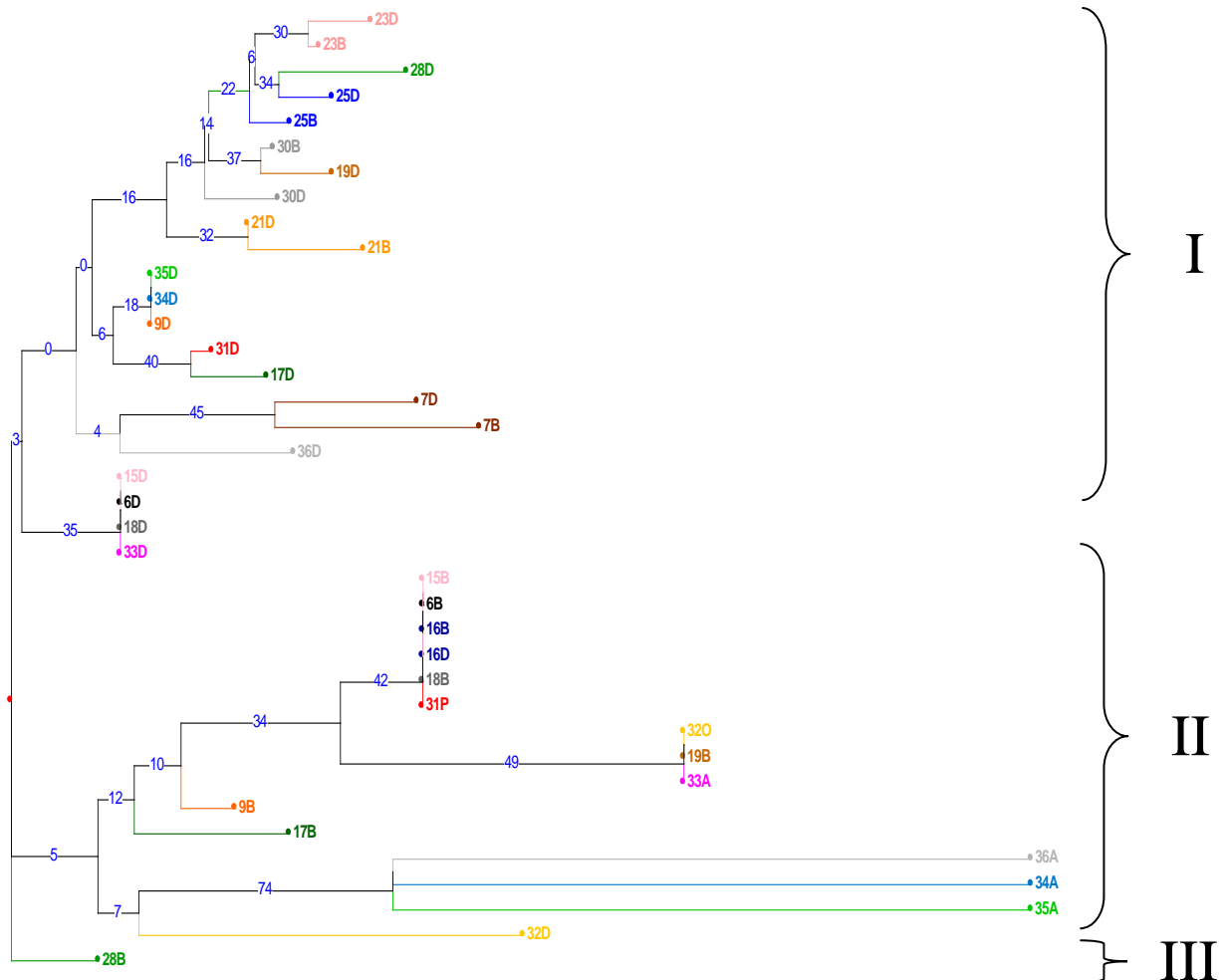
Gambar 3. Profil elektroforegram produk PCR primer Beta pada beberapa sampel kelapa sawit

Keterangan:

M = DNA ladder 1kb (Marker)

D = DNA stok berasal dari bagian daun (19, 21, 23, 25, 28, 30, 31, 32)

B = DNA stok berasal dari bagian buah (19, 21, 23, 25, 28, 30)



Gambar 4. Profil filogenik dendrogram *Neighbor-Joining* dari 38 sampel DNA stok kelapa sawit berdasarkan *Matrix Dissimilarity Simple Matching* dengan primer Beta

Amplikon-amplikon DNA dari primer Beta diterjemahkan atau lebih umum disebut diskoring, ke dalam bentuk data binari yaitu dengan menuliskan angka 1 bila terdapat amplikon dan angka 0 bila tidak terdapat pita. Data binari dari pita yang telah diskoring kemudian dianalisis dengan menggunakan software DARwin 6.0.13 sehingga didapatkan hasil yaitu dendogram Pada Gambar 4.

Dendogram adalah pohon filogenetik yang menggambarkan pengelompokan sampel dengan *Operational Taxonomic Unit* (OTU) yang berderet rata secara vertikal pada satu sisi yang berbentuk pohon. Setiap cabang pada dendogram dilakukan analisis kepercayaan cabang dengan metode *bootstrap* yang dilakukan sampai 1000 kali.

Pada penelitian ini diketahui bahwa 38 sampel DNA stok kelapa sawit terbagi menjadi tiga kelompok utama yang masing-masing memiliki sub-kelompok. Kelompok pertama (sampel 23D, 23B, 28D, 25D, 25B, 30B, 19D, 30D, 21D, 21B, 35D, 34D, 9D, 31D, 17D, 7D, 7B, 36D, 15D, 6D, 18D, dan 33D), kelompok kedua (sampel 15B, 6B, 16B, 16D, 18B, 31P, 32O, 19B, 33A, 9B, 17B, 36A, 34A, 35A, dan 32D), dan kelompok ketiga (sampel 28B). Hal ini menunjukkan bahwa adanya variasi genetik di antara sampel yang satu dengan sampel lainnya menyebabkan perbedaan yang dapat dibedakan atau dikelompokkan dengan jelas. Keragaman genetik yang tinggi membuka peluang yang besar untuk mendapatkan kultivar unggul dari tetua-tetua yang potensial.

Setelah diamati profil filogenik dengan menggunakan primer Beta pada Gambar 4 terlihat bahwa masing-masing sampel terlihat pengelompokan yang unik, seperti pada sampel 28B (isolasi DNA dari buah oringin Angola dan jenis buah *virescens*). Hasil tersebut menunjukkan keunikan tersendiri dari sampel ini yang diduga disebabkan oleh keadaan geografis dari tetua-tetua tanaman sampel yang terpilih yang terisolir dari sampel lain.

Primer beta yang digunakan pada sampel ini juga berpengaruh terhadap pola pita elektroforegram yang dihasilkan dan kemudian dianalisis menggunakan software DARwin 6.0.13. Primer beta merupakan primer spesifik yang menandai gen penyandi lintasan beta karoten. Hal ini menyebabkan pola pita yang dihasilkan unik dari sampel stok DNA yang satu dengan yang lain.

SIMPULAN

Produk PCR yang diamplifikasi dengan menggunakan marka molekuler terkait karakter beta karoten pada tanaman kelapa sawit (primer Beta) menunjukkan pola pita (amplikon) yang beragam. Terdapat perbedaan pola pita pada sampel yang berasal dari individu yang sama tetapi berbeda sumber bagian tanaman yang diisolasi. Pada penelitian ini diperoleh analisis dendogram yang menunjukkan semua 38 sampel stok DNA terbagi menjadi 3 kelompok utama.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh staff dan karyawan PT. Socfin Indonesia atas ketersediaannya mengizinkan dilaksanakannya penelitian di SSPL (Socfin Seed Production and Laboratories) Bangun Bandar, Dolok Masihul, Serdang Bedagai-Sumatera Utara dan Aek Loba Estate.

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian Nomor: 017/SP2H/LT/DRPM/II/2016, tanggal 17 Februari 2016.

DAFTAR PUSTAKA

Bahagiawati. 2011. Bioteknologi jalan pintas angkat produksi petani. *Agro*

- Inovasi*. Edisi 16-22 Maret 2011 No. 3397 Tahun XLI.
- Ferreira, M. E. en D. Grattapaglia. 1998. Introducao ao uso de marcadores moleculares em analise genetica. Embrapa-Cenargen. Brasilia.
- Kementrian Perdagangan. 2013. Market Brief Kelapa Sawit dan Olahannya. ITPC – Hamburg.
- Malaysian Palm Oil Board. 2003. Natural palm oil from tropical tradition. www.totrienol.org/. webpage 1 [Diakses pada 16 Desember 2015].
- Mangoensoekarjo, S. dan H. Semangun. 2008. Manajemen Agrobisnis Kelapa Sawit. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Olson, J. A. 1999. *Carotenoids*. dalam: Shils, M. E., J. A. Olson, M. Shike, and A. C. Ross. eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th edition. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. Hal. 525 – 541.
- Orozco–Castillo, K. J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell, 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffe using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934 – 940.
- Perrier, X. and J. P. Jacquemoud-Colled. 2009. DARwin Software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Putri, L. A. P. 2010. Pendugaan Parameter Genetik dan Karakterisasi Molekuler Keragaman Genetik dengan Marka Mikrosatelit (SSR) pada Kelapa Sawit. [Disertasi]. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Putri, L. A. P., Muhdi, Meiriani, dan S. Diana. 2007. Desain primer spesifik untuk gen yang berperan pada biosintesis beta karoten kelapa sawit. *Agrista*. 11 (2): 73 – 80.
- Santoso, D. 2001. Pengembangan pelacak DNA spesifik gen melalui bioinformatika: Indentifikasi gen penyandi protein biji 21 kDa pada kakao UAH Indonesia. *Menara Perkebunan*. 69 (1): 10 – 17.
- Wilkins, T.A. and L. B. Smart. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue In Krieg, P.A. (Ed). *A Laboratory Guide to RNA Isolation, Analysis and Synthesis*. Wiley – Liss. New York.