

Analisis RAPD Klon Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) dengan Genotipe Normal dan Abnormal

Sarro Ina Ita Bangun

Fakultas Biologi Universitas Nasional

Abstrak

Masalah terbentuknya bunga dan buah abnormal pada klon kelapa sawit sampai saat ini belum terungkap dengan jelas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesamaan genetik, pengelompokan antar genotipe normal dan abnormal, serta menetapkan pita DNA penciri untuk abnormalitas berdasarkan analisis RAPD. Bahan tanam yang dianalisis adalah Klon MK152, MK203, MK209 dan MK 212 (berbuah normal / abnormal, dan berbunga jantan), serta Klon MK104 dan MK176 (berbuah normal dan abnormal) berumur 5 tahun. Reaksi amplifikasi DNA menggunakan 15 primer acak. Kesamaan genetik dan pembuatan fenogram dilakukan dengan program NTSYS-pc. Tingkat kepercayaan UPGMA ditetapkan dengan analisis *bootstrap* menggunakan program *WinBoot*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa primer OPC-09, SC10-19, OPC-07 dan OPW-19 mampu membedakan genotipe normal dan abnormal dalam klon yang sama untuk enam klon yang diuji. Sedang primer lainnya hanya mampu menunjukkan perbedaan antar genotipe normal dan abnormal dalam beberapa klon saja. Kesamaan genetik antar genotipe yang diuji berkisar 0,47-0,96. Kesamaan genetik antar genotipe normal lebih tinggi dibandingkan dengan antar genotipe abnormal atau antar normal dengan abnormal. Klon MK176 lebih stabil di dalam kultur dibandingkan dengan klon lainnya. UPGMA menunjukkan bahwa umumnya genotipe normal dan abnormal dalam klon yang sama berada dalam satu grup. Seluruh primer yang diuji belum mampu menghasilkan pita DNA penciri untuk abnormalitas.

Abstract

The formation of flower and fruit abnormalities in oil palm still unclear. The aim of this study is to analyze the genetic similarities, grouping among normal and abnormal genotypes and to obtained a specific DNA band for abnormalities by RAPD analysis. Plant materials have been used i.e. MK152, MK203, MK209 dan Mk212 (normal / abnormal and male flowers), while clones MK104 and Mk176 (normal and abnormal). Amplification of DNA samples have been done 15 random primers. Genetic similarities and phenogram were analyzed with NTSYS-pc. While UPGMA were analyzed by bootstrap with WinBoot program. The results showed that OPC-09, SC10-19, OPC-07 and OPW-19 primers werer able to differentiate normal and abnormal genotype in the same clone for all of clones have been tested. While others primers were able to differentiate between normal and abnormal genotypes only in several clones. The genetic similarities of 16 genotypes 0,47-0,96. Genetic similarities between normal genotype is higher than the genetic similarities among abnormal or normal with abnormal. MK176 clone more stable in culture compare with others clones. UPGMA showed that generally the genotype normal and abnormal within the same clone belong to the same group. All of the primers have been tested can not be able to give a specific DNA band as an abnormalities character.

Keywords: *Elaeis guineensis*, abnormalities, RAPD-analysis, genetic similarity, UPGMA

1. PENDAHULUAN

Salah satu yang umum ditemukan pada klon kelapa sawit yang dihasilkan dari kultur jaringan adalah terjadinya abnormalitas pada bunga dan buah. Dalam proses abnormalitas ini terjadi konversi satu atau lebih primodial anter menjadi karpel tambahan yang lunak dan berkembang menjadi buah mantel (Corley *et al.*, 1986). Hal yang sangat ekstrim dari abnormalitas ini adalah tidak terbentuknya buah karena tandan buah dipenuhi oleh bunga jantan atau buah bermantel berat yang menyebabkan hilangnya produksi. Tidak adanya kualiti kontrol yang efektif untuk abnormalitas pada produksi, dan belum lengkapnya pemahaman

mengenai penyebab abnormalitas di dalam perkembangan kultur in vitro berakibat pada tertundanya upaya untuk memproduksi bibit unggul kelapa sawit secara klonal.

Beberapa penelitian dengan pendekatan molekuler telah dilakukan untuk memahami masalah abnormalitas pada klon-klon kelapa sawit di antaranya dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Darussamin dan Nurhaimi-Haris (1997) menemukan beberapa nomor primer ABI dan OPB yang digunakan dalam analisis RAPD mampu membedakan antar genotipe kelapa sawit yang berbuah normal dan abnormal dari klon SOC, MK, LMC dan BC. Namun, tidak ditemukan pita DNA spesifik untuk karakter abnormal. Nurhaimi-Haris

(1998) menggunakan analisis UPGMA-RAPD menemukan bahwa genotipe tanaman yang berbuah normal dan abnormal dari satu klon yang sama berada dalam satu kelompok. Diperoleh juga bahwa klon SOC cenderung tidak stabil apabila diperbanyak secara *in vitro* dibandingkan dengan klon LMC dan MK.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi yang lebih jauh mengenai pemanfaatan RAPD untuk menganalisis keragaman genetik, pengelompokan genotipe yang diuji (normal dan abnormal), menetapkan klon yang lebih stabil di dalam kultur, maupun menetapkan pita pembeda antar klon-klon kelapa sawit yang berbuah normal dan abnormal.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Lab. Biologi Molekuler dan Imunologi Unit penelitian Bioteknologi perkebunan (UPPB) Bogor. Waktu penelitian bulan Januari-Juli 2002. Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu Seleksi Primer dan Analisis RAPD Klon Kelapa Sawit dari genotipe yang normal dan abnormal (berbunga jantan dan berbuah mantel berat)

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6 klon kelapa sawit berumur 5 tahun yang tumbuh di Kebun Percobaan milik BPPT, Ciampea, Bogor. Klon MK152, MK203, Mk209 dan MK212 (berbunga jantan, berbuah normal dan abnormal), sedang klon Mk176, Mk104 (berbuah normal dan abnormal).

DNA diekstraksi dari 0,3 g daun muda menurut metode Orozco Castillo *et al.* (1994) yang telah dimodifikasi oleh Toruan – Mathius dan Hutabarat (1996). Amplifikasi DNA dengan PCR berdasarkan metode William *et al.* (1990). Sebanyak 15 primer acak yang digunakan merupakan hasil seleksi terhadap 31 primer acak 10-mer (Opron Alameda Tech).

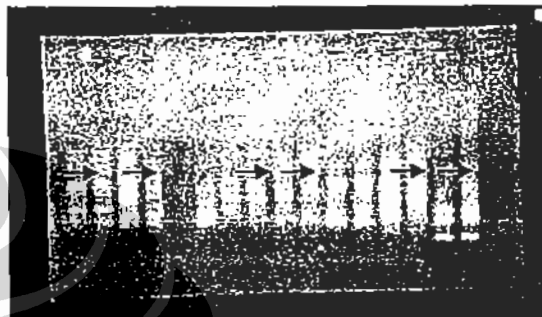
Untuk menentukan kesamaan genetik antar genotipe yang dianalisis, seluruh pita DNA yang polimorfik ditetapkan dengan ada (1) dan tidaknya (o) pita yang sama. Pita fragmen DNA yang dibaca dari hasil elektroforesis adalah yang tergolong tajam dan medium. Kesamaan antar genotipe ditentukan menurut Nei dan Li (1979). Pengelompokan data matriks dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode *Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic* (UPGMA), fungsi *Similarity Qualitative* (SIMQUAL) menggunakan program komputer NTSYS-pc (Rohlf, 1993). Tingkat kepercayaan dari dendrogram berdasar UPGMA ditentukan melalui analisis *bootstrap* menggunakan program *WinBoot* dengan pengulangan 2000 kali (Yap dan Nelson, 1996).

Diagram pencar dua dimensi dibuat berdasarkan analisis komponen utama (AKU) yaitu analisis yang mereduksi banyaknya peubah asal menjadi beberapa

peubah baru yang dapat menjelaskan keragaman data asal, menggunakan program MINITAB 11.12.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi DNA dengan 15 primer yang digunakan menghasilkan fragmen DNA dengan berat molekul berkisar antara 200-2500pb. Primer OPC-07, OPC-09, SC10-19 (Gambar 1), dan OPW-19 mampu menunjukkan perbedaan genotipe normal dan abnormal pada masing – masing klon untuk semua klon yang diuji. Primer lainnya umumnya mampu menunjukkan perbedaan genotipe normal dan abnormal hanya pada beberapa klon.



Gbr 1. Hasil amplifikasi klon MK203 berbuah abnormal dan normal dengan primer terseleksi OPA-02(1,2), OPA-04(3,4), OPA-07(5,6), OPB-05 (7,8), OPB-06(9,10), OPN-10(11,12), OPN-16(13,14), OPN-18(15,16).

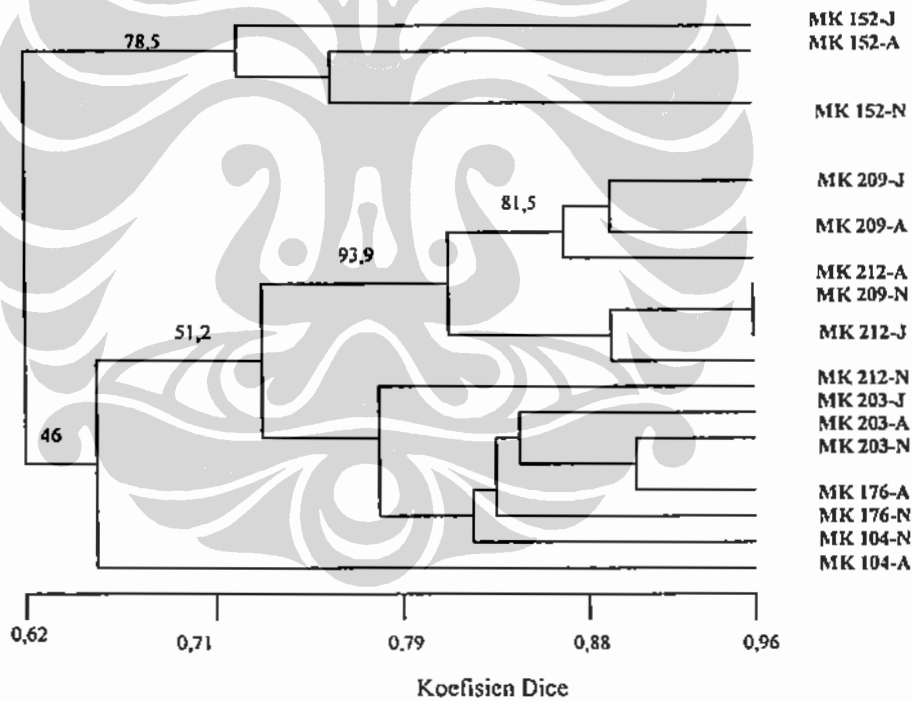
Ket: (1,2 : abnormal, normal dst).

→ primer yang terseleksi

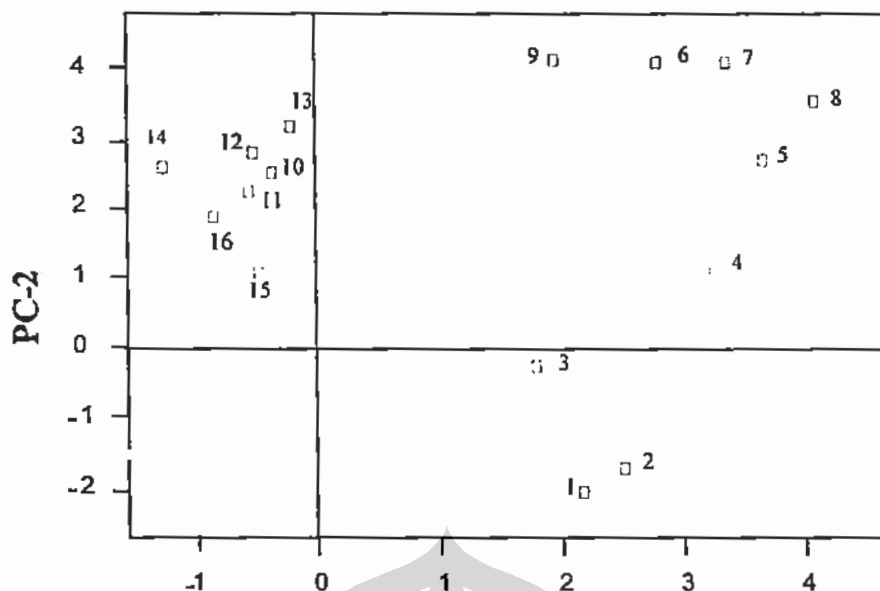
Kesamaan genetik ke enam belas genotipe yang diuji adalah berkisar antara 0,47-0,96. Dari hasil yang diperoleh tampak bahwa terjadi pergeseran kesamaan genetik dari kisaran perbedaan yang rendah antar klon yang normal, ke arah perbedaan kesamaan genetik dengan kisaran yang lebih tinggi baik antar genotipe normal vs abnormal maupun antar genotipe abnormal (berbuah mantel) dan berbunga jantan. Kesamaan genetik antar genotipe dalam satu klon juga sangat beragam (Tabel 1).

Tabel 1. Matriks kemiripan genetik berdasarkan pola pita DNA terhadap 16 genotip dari 6 klon kelapa sawit.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.00															
0.76	1.00														
0.70	0.80	1.00													
0.68	0.68	0.77	1.00												
0.63	0.65	0.73	0.91	1.00											
0.59	0.63	0.71	0.79	0.87	1.00										
0.58	0.64	0.71	0.78	0.85	0.96	1.00									
0.58	0.65	0.68	0.85	0.89	0.84	0.86	1.00								
0.56	0.59	0.69	0.77	0.80	0.87	0.89	0.84	1.00							
0.47	0.54	0.66	0.66	0.68	0.66	0.66	0.65	0.75	1.00						
0.57	0.59	0.71	0.70	0.72	0.74	0.71	0.71	0.77	0.79	1.00					
0.55	0.61	0.72	0.70	0.73	0.78	0.76	0.70	0.78	0.80	0.85	1.00				
0.54	0.62	0.73	0.72	0.75	0.82	0.78	0.72	0.80	0.77	0.85	0.93	1.00			
0.49	0.53	0.65	0.65	0.67	0.70	0.68	0.64	0.74	0.77	0.84	0.83	0.81	1.00		
0.54	0.59	0.59	0.59	0.59	0.63	0.62	0.60	0.64	0.56	0.73	0.67	0.69	0.69	1.00	
0.58	0.62	0.71	0.67	0.69	0.75	0.71	0.65	0.74	0.69	0.78	0.83	0.85	0.82	0.73	1.00



Gbr 2. Dendogram 16 genotipe kelapa sawit hasil analisis kluster berdasarkan pola pita DNA dengan metode UPGMA menggunakan 15 primer acak.



Gbr 3. Pemetaan KU1 dan KU2 terhadap klon MK152, MK209, MK212, MK203, MK176, MK104
 Ket : 1-3 MK152; 4,5,8 MK209, MK209_n, MK212_n; 6,7,9 MK209_n, MK 212_n, MK212_n
 10-14 MK203_n, MK203_n, MK176_n, MK176_n, dan 16 MK104_n; 15 MK104_n

Hasil UPGMA menunjukkan bahwa 16 genotipe kelapa sawit yang diuji terbagi menjadi dua kelompok besar (kluster utama) pada tingkat kemiripan genetik sebesar 0,62. Kelompok A terdiri dari 3 genotipe klon Mk152 dan kelompok B terdiri dari (B1) 12 genotipe dan (B2) MK104-abnormal (Gambar 2). Tingkat kepercayaan pengelompokan MK209 normal dengan Mk212 jantan dan Mk203 normal dengan Mk176 abnormal mempunyai tingkat kepercayaan yang tinggi berturut - turut 99% dan 95,6%. Sedang tingkat kepercayaan pengelompokan genotipe lainnya di bawah 90%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ada kecenderungan bahwa genotipe di dalam klon yang sama berada di dalam kelompok yang sama (Gambar 2).

Diperoleh enam komponen utama (KU) yang mempunyai akar ciri lebih dari satu. Nilai keragaman KU I dan KU II masing - masing dapat menerangkan keragaman data asal sebesar 23% dan 21% (total 44%). Hasil ini menunjukkan bahwa 44% keragaman dari 115 pita RAPD yang diperoleh dapat diterangkan oleh kedua komponen utama ini (Gambar 3). Dari KU I dan KU II masing - masing diperoleh sebanyak 26 dan 25 pita yang paling berperan dalam pengelompokan ke enam klon kelapa sawit yang diuji. Pengelompokan yang diperoleh pada diagram pencar dua dimensi hasil analisis KU memperlihatkan pola yang sama dengan dendrogram (Gambar 2) yang diturunkan dari matriks kemiripan genetik. Tampak bahwa klon MK104 berbuah tidak normal terpisah dari klon yang lainnya.

Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa antar genotipe tanaman yang berbuah normal dan

abnormal dalam satu klon hanya dibedakan oleh satu atau beberapa pita DNA. Pita DNA pembeda tersebut tidak sama untuk masing-masing klon. Hal ini menyebabkan sangat sukar untuk menentukan perbedaan pola pita DNA genotipe normal dan abnormal antar klon yang diuji. Hasil yang diperoleh ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan fragmen DNA yang mencirikan abnormalitas pada masing-masing klon. Diduga abnormalitas disebabkan oleh adanya perubahan susunan oligonukleotida pada untai DNA yang terjadi secara acak dan berbeda untuk masing-masing klon. Darussamin dan Nurhaimi (1997) dan Nurhaimi (1998) menemukan hal yang sama pada beberapa klon SOC, LMC dan MK (58, 60, 70 dan 87).

Tampak bahwa klon yang memiliki kisaran kesamaan genetik tertinggi (0,78-0,96) antar genotipe adalah klon MK 209, sedang yang paling rendah (0,81-0,82) adalah klon MK 176. Walaupun eksplan dari klon tersebut diberi perlakuan yang sama selama di dalam proses pengkulturan *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa klon MK 209 kemungkinan mengalami perubahan susunan basa DNA yang lebih besar dibandingkan dengan klon yang lainnya. Eksistensi keragaman genetik di dalam klon MK 209 mungkin berhubungan dengan kestabilan jaringan dari klon tersebut untuk merespon perlakuan di dalam kultur. Hasil yang diperoleh ini memperkuat dugaan bahwa abnormalitas terjadi akibat adanya perubahan dalam susunan oligonukleotida secara acak yang berbeda antar klon.

Untuk mengatasi masalah tersebut dalam beberapa tahun terakhir ini beberapa kelompok peneliti dari

Inggris, Malaysia, Colombia dan Papua New Guinea telah melakukan kajian untuk menyempurnakan protokol teknik kultur jaringan yang digunakan untuk memproduksi bibit klonal yang unggul. Khususnya pada klon yang diklasifikasikan beresiko rendah dan medium dalam merespon perlakuan di dalam kultur. Perubahan di dalam memperpendek masa transfer dan menurunkan ratio konsentrasi NAA/kinetin komposisi medium sangat mempengaruhi terbentuknya bunga mantel dan bunga jantan pada tanaman klon di lapang. Sampai saat ini hal tersebut masih dalam penelitian yang intensif (Eeuwens *et al.*, 2002)

Kesamaan genetik antar klon yang berbuah normal berkisar antara 0,71-0,82 yang artinya masing-masing klon memiliki kesamaan genetik yang cukup tinggi.

4. KESIMPULAN

Primer OPC-08, SC10-19, OPC-07 dan OPW—19 mampu membedakan genotipe normal dan abnormal dari klon yang sama untuk seluruh klon yang diuji. Sedang primer lainnya hanya mampu membedakan genotipe normal dan abnormal pada beberapa klon tertentu. Kesamaan genetik antar klon normal lebih tinggi dibandingkan dengan kesamaan genetik antar genotipe normal vs abnormal maupun antar genotipe abnormal. Klon MK 176 lebih stabil di dalam kultur dibandingkan dengan klon yang lainnya. Genotipe yang berbeda dari klon yang sama umumnya menjadi anggota dalam satu kelompok yang sama. Belum diperoleh pita DNA penciri untuk abnormalitas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Bersama ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Prof. Dr. Drh. Maria Bintang, MS dan Dr. Nurita Toruan – Mathius MS.APU yang telah membantu penulis menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- [1] Corley, R.H.V., Lee, C.H., Law I.H. and Wong C.Y. *Abnormal flower development in oil palm clones*. The Planter (1986) 62,233-240.
- [2] Eeuwens, C.J., Corley, R.H.V., Lord, S., Donough, C.R., Rao, V., Vallejo, G and Nelson, S. "Mantled" flowering in oil palm : *The importance of culture conditions during embryoid multiplication*. International Oil Palm Conference, Bali, 8-12 July 2002 .
- [3] Nei, M. and Li, W. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1979) 767 : 5269-5273.
- [4] Nurhaimi-Haris and Darussamin, A. *RAPD analysis of oil palm clones with normal and abnormal fruits*. Menara Perkebunan (1997) 65, (2) : 64-74.
- [5] Nurhaimi-Haris. *Analysis of fruiting abnormality among oil palm (Elaeis guineensis Jacq) clones by RAPD technique*. Menara Perkebunan. (1998) 66 (2) : 55-63.
- [6] Orozco – Castillo, K., Chalmers, J., Waugh, R and Powell, W. *Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers*. Theor. Appl. Genet. (1994) 87: 934-940.
- [7] Rohlf, F.J. NTSYS – PC. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software, New York. (1993).10-13.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd. Cold Spring Harbour Lab Press. New York. (1989) 6.1 –6.7
- [9] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. *DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nuclei acid Res., (1990) 18 (22) 6531-6535.
- [10] Yap, I.V. and Nelson, R.J. *WinBoot*. IRRRI Manila. (1996) 22-25