

ANALISIS TETUA DAN LEGITIMASI HASIL PERSILANGAN TERKONTROL PADA TANAMAN KELAPA SAWIT MENGGUNAKAN MARKA SSR

PARENTAGE ANALYSIS AND LEGITIMATION OF CONTROLLED CROSSING ON OIL PALM USING SSR MARKER

Hani Widhianata

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, INSTIPER Yogyakarta
E-mail korespondensi: hani_widhianata@yahoo.com

ABSTRACT

The oil palm gives the highest yields per hectare of all oil crops at present. The high and increasing yields of the oil palm have led to a rapidly expanding world industry, now based in the tropical areas of Asia, Africa and America. The switch to the D x P or T hybrid planting material can increase productivity per unit area. However controlled pollination of oil palms is difficult and prone to various sources of error. Illegitimacy is a silent factor that has a negative impact on controlled crossing in the oil palm. Illegitimacy can happen in any stage of the controlled crosses in the oil palm, from the initial stage of selecting and labeling parents, to the initial stage in field trial. The use of molecular markers improves the integrity of breeding programs in perennial crops such as oil palm. In plant breeding programmes, it is important to know the parentage of families and individuals for a variety of reasons. SSR analysis can be used for correct parentage assignment in progeny trials of oil palm. Paternity analysis of 83 half sibs progenies from 5 female parents and one male parent with 16 SSR markers detected all individual that clearly belong to the family they were assigned.

Keyword : Crosses, Legitimation, Parentage, Oil Palm, SSR

PENDAHULUAN

Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) adalah tanaman penghasil minyak terbanyak per hektar diantara tanaman penghasil minyak lain yang ada saat ini. Perkembangan peningkatan hasil minyak tanaman kelapa sawit berlangsung cepat di daerah tropis seperti Asia, Afrika dan Amerika (Corley dan Tinker, 2003). Pergantian bahan tanam ke hasil

persilangan Dura (D) x Pisifera (P) atau hibrida Tenera (T) sangat cepat khususnya di Malaysia dan Indonesia (Soh *et al.*, 2017). Hal ini dilakukan untuk meningkatkan produktivitas tanaman per satuan luas. Untuk mendapatkan hibrida T dilakukan persilangan antara tetua D dan P.

Analisis tetua diperlukan untuk mengetahui kebenaran proses persilangan yang telah dilakukan.

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

Analisis tetua sangat penting dilakukan dalam usaha pemuliaan tanaman karena dalam pelepasan varietas, asal usul tanaman harus diketahui secara jelas. Analisis tetua juga digunakan untuk mengetahui adanya kontaminasi dari campuran aksesi lain.

Analisis tetua dapat dilakukan dengan menggunakan penanda genetik. Penanda genetik terbagi menjadi tiga macam yaitu penanda morfologi, penanda biokimia, dan penanda DNA. Penanda DNA merupakan penanda yang paling efisien dan akurat untuk identifikasi individu dan analisis tetua, karena bersifat stabil dan tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Jones *et al.*, 2010). Penanda DNA dapat bersifat dominan maupun kodominan dan bahkan polimorfik (*multiple allelic*), sehingga dapat memberikan informasi yang akurat dalam analisis tetua untuk menduga tetua jantan yang terlibat dalam penyerbukan silang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran hasil persilangan terkontrol untuk mendapatkan hibrida tenera (T). Hasil analisis DNA menunjukkan kebenaran dalam persilangan terkontrol dan tidak ditemukan adanya campuran aksesi

lain dalam populasi persilangan yang diuji.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada bulan Januari sampai April 2019. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 5 populasi hasil persilangan terkontrol beserta satu tetua sumber polen dan 5 tetua induk. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA meliputi larutan penyangga ekstraksi (2% CTAB, 0.1 M Tris-Hydrochloric Acid (HCl) pH 8.0, 1.4 M Sodium Klorida (NaCl), 0.02 M EDTA, 2% Polyvinylpyrrolidone (PVP), 2% β -mercapto-ethanol, dan akuabides), CIAA, Sodium Asetat (NaCl), isopropanol, etanol absolut, dan etanol 70%. Bahan yang digunakan untuk kuantifikasi DNA meliputi akuabides dan template DNA. Bahan yang digunakan untuk amplifikasi DNA meliputi 10 primer SSR. Larutan reaksi PCR yang digunakan sebanyak 10 μ l yang terdiri atas primer forward (F) dan reverse (R) masing-masing 0.25 μ l, 5 μ l *GoTaq Green*, 2.25 μ l NFW (*Nuclease Free Water*), dan 2.5 μ l DNA. Bahan yang digunakan untuk elektroforesis

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

meliputi 0,6 g metaphor agarosa, 1x penyangga TBE, dan pewarnaan DNA. DNA daun teh diekstraksi menggunakan metode modifikasi 2x Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) (Doyle dan Doyle, 1990). DNA hasil ekstraksi kemudian dikuantifikasi dengan menggunakan *GeneQuant* untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA.

Penelitian ini menggunakan 16 primer SSR untuk amplifikasi DNA menggunakan thermocycler. Volume total setiap tabung PCR adalah 10 µl. Campuran reaksi PCR tersebut terdiri atas 0,25 µl primer, 5 µl *GoTaq Green*, 2,25 µl NFW (*Nuclease Free Water*), dan 2,5 µl DNA. PCR yang digunakan untuk amplifikasi DNA adalah Bio Rad T100TM Thermal Cycler. Pemanasan pertama dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik, diikuti oleh 54 siklus *Touchdown* dengan suhu dan waktu pada setiap siklus adalah denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan pada suhu terpilih (60 °C, 58 °C, 56 °C, 54 °C, 52 °C, dan 50 °C) selama 45 detik, dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik. Siklus terakhir diikuti oleh pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 30 detik. Hasil amplifikasi menggunakan PCR kemudian

dilakukan elektroforesis. Analisis data untuk mendapatkan hasil analisis tetua dan legitimasi persilangan dilakukan dengan menggunakan software Cervus dan Colony.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penanda SSR banyak digunakan untuk analisis fingerprinting tanaman karena merupakan penanda yang bersifat kodominan, terdistribusi merata di dalam genom dan mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi (Fujimori *et al.*, 2003). Sebanyak 16 lokus SSR yang mewakili 16 kromosom tanaman kelapa sawit telah dipilih dari peta genetik tanaman kelapa sawit dan telah dilakukan proses skrining untuk penggunaan lebih lanjut. Berdasarkan hasil analisis data yang telah dilakukan (Tabel 1), jumlah alel (k) untuk tetua dan progeni hasil persilangan dengan menggunakan 16 penanda SSR yang dipilih berkisar dari 3 sampai 8. Dengan nilai rerata jumlah alel (k) sebesar 5,38. Penelitian sebelumnya dengan menggunakan penanda SSR pada tanaman kelapa sawit dengan menggunakan genotip yang berbeda menunjukkan adanya keragaman jumlah alel yang dideteksi diantara genotip.

Tabel 1. Analisis frekuensi alel dari 83 sampel hasil persilangan terkontrol

Locus	k	N	Hobs	Hexp	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI	HW	F(Null)
mEgCIR0353Chr16	3	73	0.342	0.383	0.333	0.927	0.818	0.705	0.431	0.667	ND	0.0427
mEgCIR3362Chr11	8	73	1.000	0.682	0.636	0.729	0.552	0.361	0.145	0.447	***	-0.2470
mEgCIR3886Chr9	6	75	0.933	0.682	0.643	0.723	0.539	0.340	0.138	0.446	***	-0.2176
mEgCIR3543Chr6	6	76	0.908	0.739	0.693	0.667	0.491	0.303	0.112	0.411	**	-0.1185
mCnCIR0038Chr13	8	75	0.820	0.731	0.679	0.69	0.516	0.337	0.122	0.417	***	-0.1337
mEgCIR0886Chr8	5	88	0.773	0.659	0.595	0.767	0.608	0.438	0.179	0.467	***	-0.1106
mEgCIR2414Chr12	5	82	0.915	0.776	0.734	0.628	0.449	0.268	0.090	0.387	*	-0.0912
mEgCIR3282Chr2	6	89	0.989	0.667	0.616	0.749	0.577	0.393	0.160	0.458	***	-0.2485
mEgCIR0173Chr3	3	86	0.872	0.635	0.559	0.801	0.655	0.505	0.208	0.486	***	-0.1863
mEgCIR3292Chr15	5	42	0.548	0.731	0.672	0.700	0.529	0.354	0.128	0.421	ND	0.1218
mEgCIR3785Chr10	6	73	0.753	0.753	0.703	0.667	0.492	0.315	0.109	0.403	***	-0.0034
mEgCIR2813Chr5	4	83	0.747	0.538	0.476	0.856	0.715	0.565	0.276	0.552	***	-0.2006
mEgCIR3533Chr4	5	84	0.845	0.684	0.618	0.750	0.590	0.423	0.164	0.451	*	-0.1151
mEgCIR0894Chr7	7	88	0.989	0.757	0.716	0.644	0.464	0.276	0.098	0.398	***	-0.1527
mEgCIR0802Chr1	5	68	0.618	0.538	0.479	0.852	0.707	0.549	0.272	0.551	NS	-0.1068
mEgCIR3546Chr14	4	88	1.000	0.608	0.525	0.813	0.680	0.530	0.236	0.507	***	-0.2707
Average	5.38	77.69	0.816	0.660	0.605	0.748	0.586	0.416	0.179	0.467	-	-

Keterangan: k = number of alleles at the locus, N = number of individual typed at the locus, Hobs = the observed heterozygosity, Hexp = expected heterozygosity, PIC = polymorphic information content, NE-1P = average non-exclusion probability for one candidate parer, NE-2P = average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex, NE-PP = average non-exclusion probability for a candidate parent pair, NE-I = average non-exclusion probability for identity of two unrelated individuals, NE-SI = average non-exclusion probability for identity of two siblings, HW = significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Key : NS = not significant, ND = not different, * = significant at the 5% level, ** = significant at the 1% level, *** = significant at the 0.1% level. These significant levels include a Bonferroni correction, F(Null) = estimated null allele frequency.

Berdasarkan Bakoume et al., (2015), keragaman dapat berasosiasi dengan jumlah sampel aksesori yang digunakan dan asal dari masing-masing populasi. Nilai heterosigositas yang teramati (Hobs) berkisar antara 0,342 sampai 1,000. Dengan nilai rata-rata Hobs sebesar 0,816. Sedangkan nilai heterosigositas yang diharapkan (Hexp) berkisar 0,383 sampai 0,776. Dengan nilai rata-rata Hexp sebesar 0.660

(Tabel 1). Rata-rata nilai Hobs yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Okoye et al., (2016) dengan rata-rata nilai Hobs sebesar 0,6296 dengan menggunakan 9 penanda SSR dan juga dari penelitian Bakoume et al., (2015), dengan nilai rata-rata Hobs sebesar 0,460 dengan menggunakan 16 penanda SSR. Tingginya nilai heterosigositas yang teramati

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

Table 2. Analisis keturunan dari 83 progeni

Offspring ID	Loci typed	Mother ID	Loci typed	Pair loci compared	Candidate father ID	Loci typed	Pair loci compared
A8	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A23	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A27	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A32	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A37	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A46	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A51	9	km002 03.14 D	16	9	km011 63.13 P	16	9
A68	14	km002 03.14 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
A76	11	km002 03.14 D	16	11	km011 63.13 P	16	11
A82	14	km002 03.14 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
A120	12	km002 03.14 D	16	12	km011 63.13 P	16	12
A125	12	km002 03.14 D	16	12	km011 63.13 P	16	12
A134	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A141	14	km002 03.14 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
A144	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A148	15	km002 03.14 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
A151	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A160	15	km002 03.14 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
A181	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
A186	16	km002 03.14 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
B2	12	km004 13.02 D	14	10	km011 63.13 P	16	12
B4	16	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	16
B10	11	km004 13.02 D	14	10	km011 63.13 P	16	11
B11	9	km004 13.02 D	14	8	km011 63.13 P	16	9
B13	16	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	16
B15	13	km004 13.02 D	14	12	km011 63.13 P	16	13
B20	13	km004 13.02 D	14	11	km011 63.13 P	16	13
B23	15	km004 13.02 D	14	13	km011 63.13 P	16	15
B25	15	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	15
B71	15	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	15
B73	14	km004 13.02 D	14	13	km011 63.13 P	16	14
B76	13	km004 13.02 D	14	12	km011 63.13 P	16	13
B77	12	km004 13.02 D	14	12	km011 63.13 P	16	12
B85	15	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	15
B130	11	km004 13.02 D	14	9	km011 63.13 P	16	11

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

B134	9	km004 13.02 D	14	9	km011 63.13 P	16	9
B144	15	km004 13.02 D	14	14	km011 63.13 P	16	15
B146	13	km004 13.02 D	14	12	km011 63.13 P	16	13
B149	10	km004 13.02 D	14	9	km011 63.13 P	16	10
B151	15	km004 13.02 D	14	13	km011 63.13 P	16	15
B152	14	km004 13.02 D	14	13	km011 63.13 P	16	14
C2	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C5	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C10	15	km002 06.01 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
C17	13	km002 06.01 D	16	13	km011 63.13 P	16	13
C20	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C28	15	km002 06.01 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
C34	11	km002 06.01 D	16	11	km011 63.13 P	16	11
C47	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C68	13	km002 06.01 D	16	13	km011 63.13 P	16	13
C74	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C76	15	km002 06.01 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
C80	15	km002 06.01 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
C95	13	km002 06.01 D	16	13	km011 63.13 P	16	13
C108	14	km002 06.01 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
C129	14	km002 06.01 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
C133	13	km002 06.01 D	16	13	km011 63.13 P	16	13
C139	15	km002 06.01 D	16	15	km011 63.13 P	16	15
C146	14	km002 06.01 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
C168	11	km002 06.01 D	16	11	km011 63.13 P	16	11
C172	16	km002 06.01 D	16	16	km011 63.13 P	16	16
C176	14	km002 06.01 D	16	14	km011 63.13 P	16	14
D2	14	km006 20.05 D	15	14	km011 63.13 P	16	14
D5	16	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	16
D10	13	km006 20.05 D	15	13	km011 63.13 P	16	13
D19	12	km006 20.05 D	15	12	km011 63.13 P	16	12
D28	12	km006 20.05 D	15	12	km011 63.13 P	16	12
D32	13	km006 20.05 D	15	13	km011 63.13 P	16	13
D39	13	km006 20.05 D	15	13	km011 63.13 P	16	13
D68	10	km006 20.05 D	15	10	km011 63.13 P	16	10
D74	9	km006 20.05 D	15	9	km011 63.13 P	16	9
D82	11	km006 20.05 D	15	11	km011 63.13 P	16	11
D86	16	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	16

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

D91	16	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	16
D95	15	km006 20.05 D	15	14	km011 63.13 P	16	15
D105	13	km006 20.05 D	15	13	km011 63.13 P	16	13
D110	12	km006 20.05 D	15	12	km011 63.13 P	16	12
D115	14	km006 20.05 D	15	13	km011 63.13 P	16	14
D121	16	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	16
D150	10	km006 20.05 D	15	10	km011 63.13 P	16	10
D164	15	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	15
D171	15	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	15
D186	16	km006 20.05 D	15	15	km011 63.13 P	16	16

Untuk memastikan bahwa tetua yang digunakan untuk produksi biji hibrida sesuai dengan yang dimaksud oleh para pemulia maka pengecekan legitimasi tetua sangat diperlukan. Bagaimanapun juga pengontrolan persilangan sangat sulit dilakukan. Banyak faktor luar yang mempengaruhi kebenaran persilangan seperti oleh serangga pada bunga betina dan adanya tikus yang menyebabkan terjadinya kontaminasi dengan polen yang tidak sesuai. Hal lain yaitu adanya penyerbukan selfing. Kesalahan bisa juga terjadi pada saat koleksi polen, pelabelan janjang, pada saat penyimpanan biji atau selama tahap perkecambahan atau pada penanaman di lapang (Corley, 2003).

KESIMPULAN

Pendekatan molekuler dapat digunakan dalam analisis tetua dan legitimasi persilangan. Dengan pendekatan molekuler diharapkan lebih akurat karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Analisis tetua dengan 83 progeni half sib dari 5 tetua induk dan 1 tetua sumber polen dengan 16 penanda SSR menunjukkan bahwa semua individu jelas merupakan keturunan dari tetua persilangan yang dimaksud. 16 penanda SSR yang digunakan dapat digunakan untuk analisis tetua dan legitimasi lebih lanjut.

Hani Widhianata : Analisis Tetua dan Legitimasi Hasil Persilangan Terkontrol.....

DAFTAR PUSTAKA

- Bakoume, C., Wickneswari, R., Siju, S., Rajanaidu, N., Kushairi, A., & Billotte, N. (2015). Genetic Diversity of the World's Largest Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Field Genebank Accessions Using Microsatellite Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62, 349-360.
- Corley, R.H.V. 2005. Illegitimacy in oil palm breeding – a review. *J Oil Pal, Res* 17: 64-69.
- Corley RHV and PB Tinker. 2003. *The Oil Palm*. Fourth Edition. Blackwell Science. Oxford. USA.
- Fujimori, S., Washio, T., Higo, K., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S. and Tomita, M. 2003. A novel future of microsatellite in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Lett.* 554: 17-22.
- Jones, A. G., C. M. Small, K. A. Paczolt, and N. L. Ratterman. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10:6-30.
- Luyindula, N., Mantantu, N., Dumortier, F. and Corley, R.H.V. 2005. Effects of inbreeding on growth and yield of oil palm. *Euphytica* 143: 9-17.
- Okoye, M. N., Bakoume, C., Uguru, M. I., Singh, R., & Okwuagwu, C. O. (2016). Genetic Relationships between Elite Oil Palms from Nigeria and Selected Breeding and Germplasm Materials from Malaysia via Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 8, No. 2.
- Soh AC, S Mayes and JA Roberts. 2017. *Oil Palm Breeding Genetics and Genomics*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton.