

EKSTRAKSI DNA & ANALISIS KERAGAMAN GENETIK 3 VARIETAS KELAPA SAWIT BERDASARKAN MARKA MOLEKULAR RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Ali Sofi¹, Achmad Himawan², Tantri Swandari²

¹Mahasiswa Fakultas Pertanian INSTIPER

²Dosen Fakultas Pertanian INSTIPER

Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Instiper Yogyakarta, Jl. Nangka II,
Maguwoharjo (Ringroad Utara), Yogyakarta 55282, Indonesia

E-mail: ali.sofi28@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan perbandingan pencucian CIAA pada ekstraksi DNA tanaman kelapa sawit varietas Simalungun, Socfindo dan First Resources serta menganalisis keragaman genetik pada varietas kelapa sawit. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2021 di Laboratorium Pusat Institiut Pertanian STIPER Yogyakarta untuk mengekstraksi sampel DNA kelapa sawit dan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gadjah Mada. Metode ekstraksi yang digunakan adalah Doyle & Doyle. Sampel yang digunakan adalah daun kelapa sawit berumur 3-12 bulan varietas Simalungun, Socfindo dan First Resources dengan berat 0,1 gram. Jumlah pengulangan sebanyak tiga kali sehingga ada 9 sampel yang dianalisis. Kualitas dan kuantitas serta keragaman genetik menjadi faktor utama parameter yang diamati. Hasil analisis ekstraksi DNA menunjukkan bahwa pencucian CIAA lebih dari satu kali mampu menghasilkan kualitas maupun kuantitas DNA lebih baik. Pencucian CIAA satu kali masih menghasilkan smear yang tebal yang dapat dibuktikan visualisasi uji kualitas DNA. Persentase variasi molekuler dibagi menjadi dua bagian yaitu keragaman antar populasi dan dalam populasi. Data dalam populasi yang didapat sangat tinggi yaitu mencapai 90% sedangkan data antar populasi cukup rendah yaitu 10%.

Kata Kunci : Kelapa sawit, CIAA, varietas, ekstraksi DNA, keragaman genetik, RAPD.

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kelapa sawit merupakan salah satu komoditas perkebunan yang mempunyai peran cukup penting dalam kegiatan perekonomian di Indonesia. Hal ini dikarenakan kelapa sawit merupakan salah satu komoditas ekspor Indonesia yang berperan sebagai penghasil devisa negara selain minyak dan gas. Sampai saat ini, kelapa sawit masih menjadi kontribusi penyumbang devisa terbesar negara, yaitu sebesar US\$ 18,9 miliar atau setara Rp. 265 triliun pada tahun 2018 (Badan Pusat Statistik, 2018).

Pembibitan kelapa sawit sangat rawan sekali dengan adanya bibit palsu. Terdapat beberapa alasan petani sering membeli bibit kelapa sawit yang ilegal petani kelapa sawit masih kerap membedakan dengan keberadaan bibit sawit palsu menurut Survei Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS). Sejumlah alasan yang mendasari, diantaranya 37 persen menjadi korban penipuan; 14 persen tertarik harga murah; 20 persen tidak mengetahui cara

membeli benih yang legal. Selain itu, 12 persen diantara petani terjebak penggunaan bibit palsu karena rumitnya persyaratan yang harus dipenuhi; 10 persen tidak mengetahui lokasi pembelian benih legal serta 4 persen petani menyatakan akibat jarak tempuh dari lahan kelapa sawit ke produsen benih legal cukup jauh.

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi kualitas dan kuantitas DNA serta analisis keragaman genetik pada setiap varietas kelapa sawit. Usaha dalam memahami metode ekstraksi DNA dan analisis genetika tanaman diperlukan adanya pelacak spesifik pita DNA yang dapat mengidentifikasi keberadaannya maupun jumlah pita DNA dengan cara yang mudah namun akurat. Pendekatan yang memanfaatkan kemajuan bioinformatika dan teknik PCR, saat ini merupakan salah satu cara yang relatif mudah yang dapat dilakukan (Santoso, 2001). Pentingnya prosedur ekstraksi DNA yang tepat sehingga akan diperoleh produk DNA yang berkualitas baik, dengan demikian akan membantu hasil analisis kekerabatan berdasarkan penanda molekular.

B. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh jumlah pengulangan proses pencucian CIAA pada setiap varietas kelapa sawit.
2. Mengetahui keragaman genetik antar dan dalam populasi tiga varietas kelapa sawit berdasarkan marka molekular RAPD.

METODE PENELITIAN

A. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2021 di Laboratorium Pusat Instituti Pertanian STIPER Yogyakarta untuk mengekstraksi sampel DNA kelapa sawit dan Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gadjah Mada untuk menguji kualitas dan kuantitas DNA serta menganalisis genetik, Daerah Istimewa Yogyakarta.

B. Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah elektroforesis, spektrofotometer, *centrifuge*, gunting, mortar, *centrifuge tube*, *water bath*, genequant. Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah CTAB, NaCl, mercapthoetanol, larutan buffer, CIAA, plastik klip, RNase, isopropanol, ethanol, dan sampel daun tiga varietas kelapa sawit. Jumlah sampel yang digunakan ada Sembilan sampel dengan ulangan tiga kali. Sampel yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari kebun penelitian dan percobaan (KP2) Instiper. Sampel berupa daun segar kelapa sawit yang berumur 12 bulan setelah semai.

C. Metode Penelitian

Ekstraksi DNA dengan modifikasi Doyle & Doyle. Panaskan buffer ekstraksi CTAB (1 % mercaptoethanol), 1500 µl per sampel pada waterbath suhu 65° C selama 30 menit, Inkubasi campuran hasil gerusan dan buffer pada suhu 65° C selama 60 menit dan setiap 10 menit dibolak-balik. Masukkan 500 µl campuran 24 chloroform : 1 isomil alkohol (CIAA). Supernatan diambil dan dipindahkan ke mikrotube yang baru, lalu diberikan CIAA. Pencucian dengan CIAA bisa dilakukan hingga 2-3 kali untuk optimasi sampel yang bersih. Tambahkan sodium asetat 3M sebanyak 1/10 dari volume supernatan. Isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume total (supernatan + sodium asetat) 500 etanol 70% kemudian ditambah 50-100 µl TE buffer + 1% RNase.

D. Tahapan Pelaksanaan Penelitian

A. Pengambilan Sampel Daun

Daun tanaman kelapa sawit yang digunakan adalah varietas Socfindo, Simalungun dan First Resources dengan sertifikat varietasnya. Pengambilan sampel daun kelapa sawit seberat 0,1 gram.

B. Ekstraksi DNA kelapa sawit menggunakan perbandingan jumlah pencucian CIAA

Panaskan buffer ekstraksi 1% CTAB (1% mercaptoethanol) pada sampel daun tanaman kelapa sawit yang berbeda (1500 µl per sampel) pada *waterbath* pada suhu 65° C selama 30 menit. Gerus sampel dengan mortar hingga lembut, lalu tambahkan larutan buffer dan campur hingga rata, lalu masukkan ke dalam microtube. Inkubasi campuran hasil gerusan dan buffer tersebut pada suhu 65° C selama satu jam dan setiap satu menit dibolak-balik. Setelah satu jam, campuran diambil dari waterbath dan didiamkan selama 2 menit kemudian ditambahkan pada setiap sampel 500 µl campuran 24 chloroform : 1 isomil alkohol (CIAA). Tinggi cairan harus seimbang, apabila tidak seimbang bisa ditambah CIAA. Campur dengan baik kemudian divortex selama 5 menit.

Pencucian CIAA bisa dilakukan hingga 3 kali apabila sampel yang dihasilkan pada pencucian pertama dirasa kurang bersih. Kebersihan sampel maupun keberhasilan ekstraksi DNA akan berpengaruh pada kualitas dan kuantitas DNA. Sampel yang telah dicampur menggunakan CIAA disentrifuse 15 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke mikrotube yang baru, catat volumenya. Tambahkan sodium asetat 3M sebanyak 1/10

dari volume supernatant tersebut dan dicampur dengan baik. Setelah itu tambahkan isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume total (supernatan + sodium asetat), campur dengan baik dengan membolak-balik tabung. Campuran didiamkan dalam freezer selama 1-24 jam. Sentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit. Buang cairan dan cuci endapan DNA dengan menambahkan 500 µl etanol 70%, bolak-balik mikrotube. Sentrifuse 5 menit pada 12.000 rpm. Buang cairan dan endapan DNA dikering-anginkan. Setelah kering, endapan DNA dilarutkan kembali dengan 50 -100 µl TE buffer + 1% RNase, inkubasi pada waterbath pada suhu 37° C selama 60 menit. Larutan DNA disimpan pada suhu 4° C.

C. Analisis Kualitas dan Kuantitas DNA

Analisis kuantitas DNA termasuk kemurnian dan konsentrasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer jenis GeneQuant 1300 pada panjang gelombang UV 260 nm dan 280 nm. Proses dalam uji kuantitas mengambil 2 µl DNA asli dan penilaian dalam proses ini melihat kemurnian dan konsentrasi DNA.

Analisis kualitas DNA yang berhasil diekstraksi menggunakan elektroforesis merk BIO RAD dengan gel agarose 1%. Proses ini juga mengambil 2 µl DNA asli lalu dicampur dengan *loading day* kemudian dicampur hingga homogen menggunakan micropipet.

D. Analisis Keragaman Genetik dengan Marka Mokular RAPD

Pemeriksaan keragaman genetik melalui DNA yang berhasil diisolasi kemudian diuji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose 1,5%. Proses amplifikasi PCR seluruh sampel menggunakan *thermal cycler* merk BIO RAD engan tahapan reaksi.

Komposisi dalam reaksi PCR :

- PCR Mix (Go Taq Green): 5 µl
- Primer RAPD : 0,5 µl
- DNA template : 2,5 µl
- *Nuclease free water* :2 µl

Kondisi PCR :

- Pre-heating : 95° C 5 menit
- Denaturasi : 95° C 1 menit
- Annealing : 37° C 1 menit
- Elongasi : 72° C 1 menit 30 detik
- Elongasi akhir : 72° C 7 menit

- Siklus : 35X

Primer RAPD yang akan digunakan perlu diseleksi terlebih dahulu. Seleksi primer RAPD yang digunakan yaitu Primer OPD 2, OPD 3, OPD 5, OPD 6, OPD 7, OPD 8, OPD 9, OPD 10, OPD 11, OPD 12, OPD 13, OPD 16, OPD 17, OPD 19 dan OPD 20.

E. Parameter Penelitian

Analisis kuantitas DNA termasuk kemurnian dan konsentrasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang UV 260 nm dan 280 nm. Hasil kuantitas DNA dikatakan baik jika kemurniannya 1,5-2 dan konsentrasinya dibawah 2000. Analisis kualitas DNA yang berhasil diekstraksi menggunakan elektroforesis dengan gel agarose 1%. Hasil kualitas DNA dikatakan baik jika pita DNA kelihatan saat divisualisasikan dengan UV Transluminator.

Analisis keragaman genetik pada tiga varietas kelapa sawit yang diuji secara kualitatif kemudian di amplifikasi PCR seluruh sampel menggunakan thermal cycler dengan tahapan reaksi. Hasil dari ini akan menghasilkan DNA Polimorfik lalu bisa digunakan untuk mendeteksi polimorfisme DNA, sehingga dapat digunakan sebagai penanda genetik dalam menentukan hubungan kekerabatan. Teknik skoring yang digunakan adalah menghitung berapa banyak pita DNA yang muncul lalu analisis data menggunakan aplikasi NTSYS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) menggunakan metode Doyle & Doyle (1990) yang dimodifikasi dengan membandingkan jumlah ulangan proses pencucian CIAA (Kloroform Iso-amil Alkohol) pada sampel tanaman kelapa sawit varietas Simalungun, First Resources dan Scofindo pada fase pembibitan *main* nursery. Hasil penelitian berupa uji kuantitatif (kemurnian dan konsentrasi DNA) yang disajikan dalam bentuk Tabel 2 dan 3. Sedangkan hasil uji kualitatif (visualisasi hasil elektroforesis) disajikan dalam gambar 1.

A. Kuantitatif DNA

1. Kemurnian DNA

Pengujian kemurnian DNA kelapa sawit hasil ekstraksi dengan metode CTAB Doyle and Doyle dilakukan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Tabel 2 menyajikan hasil kemurnian DNA pada variasi jumlah pencucian CIAA terhadap 3 varietas kelapa sawit (S) varietas

Simalungun, (F) varietas First Resources, (C) varietas Socfindo.

Tabel 1. Hasil kemurnian DNA pada variasi jumlah pencucian CIAA.

Pencucian CIAA	Varietas			Rerata
	S	F	C	
1x	1,47	1,47	1,45	1,464 a
2x	1,43	1,91	1,68	1,671 a
3x	1,47	1,37	1,39	1,410 a
Rerata	1,453 a	1,584 a	1,508 a	(-)

Keterangan : huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Hasil ekstraksi DNA dengan variasi jumlah pencucian CIAA pada tiga varietas kelapa sawit menunjukkan bahwa rata-rata yang bervariasi yakni pada nilai kemurnian 1,453-1,584 (A260/A280). Hal ini diduga dengan pencucian CIAA 1x, 2x, dan 3x belum mampu menghilangkan senyawa fenolik pada ekstrak daun kelapa sawit. Perlakuan pencucian CIAA 2x pada varietas First Resource memiliki nilai 1,91 yang artinya mampu menghilangkan senyawa fenolik dan protein pada ekstraksi daun kelapa sawit. Senyawa CIAA (*Chloroform Isoamil Alkohol*) mempunyai peran untuk menghilangkan protein dengan cara mengendapkan protein tersebut pada daun kelapa sawit. Menurut Arhan et al., (2013) dalam Sadikin et al., (2021) menyatakan bahwa ekstrak daun kelapa sawit memiliki senyawa fenolik yang tinggi jika dibandingkan dengan ekstraksi daun kelapa sawit segar. Menurut Muladno, (2010) sampel DNA dapat dikatakan murni apabila rasio kemurnian pada sampel DNA berkisar 1,8-2,0. Menurut Retnaningati (2020) dalam Sadikin et al., (2021) dalam mendapatkan kemurnian DNA dipengaruhi oleh jenis tumbuhan dan kandungan pada tumbuhan serta hasil ekstraksi DNA juga dipengaruhi oleh kandungan polifenol dan metabolit sekunder seperti tannin dan terpen yang dapat menurunkan hasil kemurnian DNA pada sampel tanaman.

2. Konsentrasi DNA

Pengujian konsentrasi DNA kelapa sawit (ng/ μ l) hasil ekstraksi dengan metode CTAB Doyle and Doyle termodifikasi dilakukan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Tabel 3 menyajikan hasil kemurnian DNA pada variasi jumlah pencucian CIAA terhadap 3 varietas kelapa sawit (S) varietas Simalungun, (F) varietas First Resources, (C) varietas Socfindo.

Tabel 2. Konsentrasi DNA pada ekstraksi daun kelapa sawit (ng/μl).

Pencucia n CIAA	Varietas			Rerata
	S	F	C	
1x	2.248,15	3.514,81	4.181,48	3.314,81a
2x	1.424,07	1.757,41	1.824,07	1.668,51a
3x	2.133,33	1.233,33	333,33	1.233,33b
Rerata	1.935,18	2.168,51	2.112,96	(-)

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (ng/μl).

Hasil ekstraksi DNA tanaman kelapa sawit pada tiga varietas terhadap variasi pencucian CIAA tabel 3 menunjukkan bahwa hasil rata-rata pencucian CIAA terhadap konsentrasi DNA bervariasi. Tabel 3 juga menunjukkan bahwa secara kuantitatif metode ekstraksi DNA pencucian CIAA 1x menghasilkan konsentrasi lebih besar (3314,81 ng/μl) dari pencucian CIAA 2x (1.668,51 ng/μl) dan pencucian CIAA 3x (1.233,33 ng/μl). Hal ini diduga dengan pencucian CIAA 1x, 2x, dan 3x belum mampu menghilangkan senyawa fenolik pada ekstrak daun kelapa sawit. Perlakuan pencucian CIAA 2x pada varietas First Resource memiliki nilai 1,91 yang artinya mampu menghilangkan senyawa fenolik dan protein pada ekstraksi daun kelapa sawit. Hal ini menunjukkan bahwa variasi jumlah pencucian CIAA mempengaruhi konsentrasi ekstraksi DNA kelapa sawit.

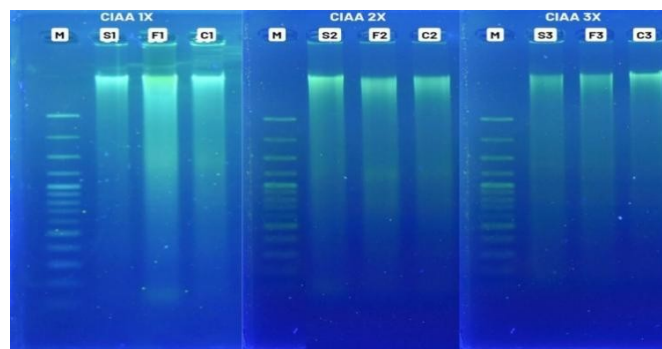
Menurut Sari dkk., (2009) tanaman kelapa sawit polisakarida dan polifenol yang tinggi, jadi perlu adanya cara khusus untuk mendapatkan konsentrasi yang baik. Pencucian CIAA 1X kurang mampu membersihkan sampel dari larutan polisakarida. Karena itu, pencucian CIAA seharusnya lebih dari satu kali agar mampu mendegradasi atau membersihkan dari larutan polisakarida dan polifenol. Menurut Fang et al., (1992) dalam Nugroho et al., (2015) senyawa polisakarida dapat menghambat kerja enzim restriksi dan *Taq polymerase* yang menyebabkan tekstur DNA menjadi kental dan lengket.

Konsentrasi DNA berdampak pada kualitas fragmen hasil amplifikasi. Apabila konsentrasi DNA terlalu rendah dapat menghasilkan fragmen yang sangat tipis pada gel atau bahkan tidak terlihat secara visual, sebaliknya konsentrasi DNA yang terlalu tinggi akan menyebabkan fragmen terlihat tebal sehingga fragmen akan sulit dibedakan antara satu fragmen dengan fragmen lainnya (Haris et al., 2003). Hal ini menentukan sampel DNA yang baik untuk digunakan proses selanjutnya seperti analisis genetik.

B. Kualitas DNA

Keberhasilan ekstraksi DNA dan analisis genetik menggunakan marka molekuler RAPD dipengaruhi oleh kualitas DNA yang dihasilkan. Berdasarkan gambar 1 menunjukkan bahwa sampel F1 (sampel DNA varietas First Resources ulangan pertama) pada pencucian CIAA 1x memiliki kualitas DNA yang kurang baik. Hal ini diduga pencucian CIAA 1x belum cukup untuk menghilangkan senyawa polisakirada atau fenolik yang ada pada daun kelapa sawit. Sampel S1 (sampel DNA varietas Simalungun ulangan pertama) dan C1 (sampel DNA varietas Socfindo ulangan pertama) pada pencucian CIAA 1x secara visual menunjukkan hasil yang kurang bagus, tetapi pita DNA yang dihasilkan tidak setebal sampel F1 (sampel DNA varietas First Resources ulangan pertama) pada pencucian CIAA 1x. Pencucian CIAA 2x dan 3x menunjukkan bahwa kualitas DNA yang dihasilkan sangat baik di setiap sampel, dikarenakan secara visual pita DNA terlihat dengan jelas dan mengindikasikan terdapat sedikit bahan pengotor.

Proses jumlah pencucian DNA menggunakan CIAA yang tidak tepat dapat menyebabkan terjadinya kontaminan pada DNA dari hasil ekstraksi. Peran CIAA adalah untuk memurnikan DNA dari protein dengan cara mengendapan protein tersebut (Sadikin et al., 2021). Menurut Bagaskara et al., (2018) dalam Sadikin et al., (2021) menyatakan bahwa pita DNA yang tidak menyebar dan tebal menunjukkan konsentrasi yang tinggi, dan total DNA yang dihasilkan dari ekstraksi masih utuh dan diperlukan perlakuan yang tepat dalam mengekstraksi DNA untuk mendapatkan kualitas DNA yang baik.

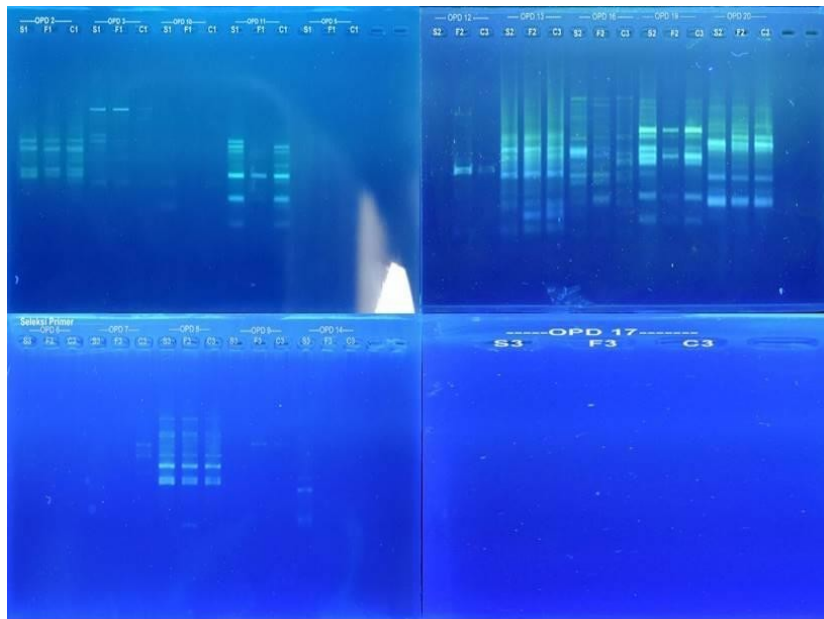


Gambar 1. Visualisasi uji kualitas DNA menggunakan elektroforesis dengan metode pencucian CIAA; (S) varietas Simalungun, (F) varietas First Resources, (C) Socfindo.

3. Analisis Genetik Menggunakan Marka Molekuler RAPD

A. Seleksi Primer

Keberhasilan ekstraksi DNA dengan analisis genetik menggunakan RAPD adalah dengan menggunakan parameter seleksi Primer yang dapat dilihat digambar:



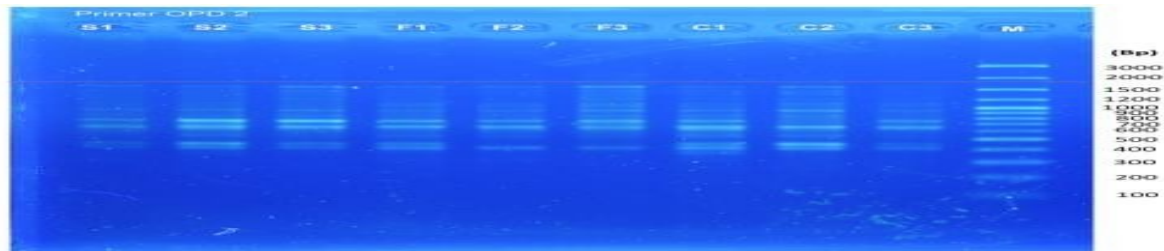
Gambar 2. Visualisasi seleksi 16 primer RAPD menggunakan elektroforesis ; (S) varietas Simalungun, (F) varietas First Resources, (C) Socfindo.

Berdasarkan Gambar 2 identifikasi primer yang digunakan menggunakan 16 Primer RAPD yaitu primer OPD 2, OPD 3, OPD 5, OPD 6, OPD 7, OPD 8, OPD 9, OPD 10, OPD 11, OPD 12, OPD 13, OPD 14, OPD 16, OPD 17, OPD 19, dan OPD 20. Pada tahap seleksi primer tidak semua primer dapat digunakan, primer RAPD yang dapat digunakan hanya 5 Primer RAPD yaitu primer OPD 2, OPD 8, OPD 11, OPD 19, OPD 20. Kelima OPD Primer yang digunakan karena mampu menunjukkan pita DNA berdasarkan hasil analisis seleksi primer menggunakan elektroforensi.

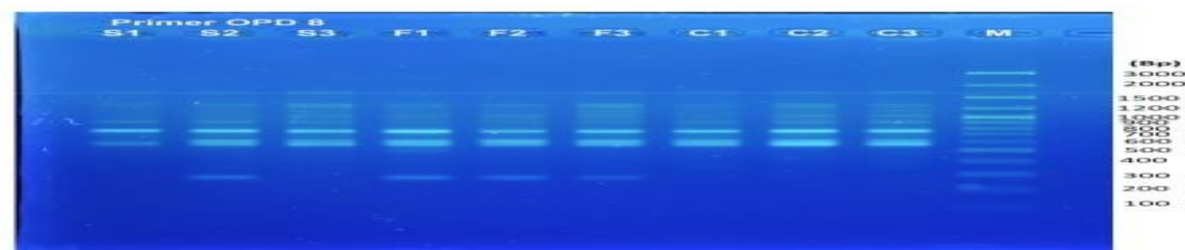
Jumlah pita DNA yang dihasilkan dari kelima OPD adalah 12 pasang pita DNA yaitu 350 bp, 400 bp, 450 bp, 550 bp, 650 bp, 750 bp, 950 bp, 1100 bp, 1200 bp, 1400 bp, 1500 bp, dan 1700 bp. Menurut Williams et al., (1990) dalam Simbolon et al., (2017) jumlah pada setiap primer tergantung pada penyebaran situs homolog pada genom. Fragmen yang tidak muncul disebabkan tidak terjadinya amplifikasi mungkin terjadi karena primer RAPD yang digunakan tidak sesuai dengan DNA cetakan. Menurut Williams et al., (1990) beberapa bukti penelitian menunjukkan bahwa perbedaan satu pasang basa saja cukup menyebabkan ketidaksesuaian cetakan primer yang kemudian mencegah amplifikasi. Salah satu penyebab yang membuat tidak terjadinya amplifikasi yaitu rendah dan tingginya konsentrasi pada sampel DNA. Rasio yang rendah antara primer dan DNA cetakan dapat menyebabkan produk RAPD yang dihasilkan tidak konsisten. Faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan proses elektroforesis adalah ukuran molekul DNA, komposisi buffer elektroforesis, primer RAPD yang digunakan

konformasi DNA, konsentrasi gel agarose, dan proses PCR RAPD. Tahap seleksi primer sangat penting untuk penggunaan primer agar mampu memberikan informasi terkait pola DNA untuk skoring. Optimasi primer menggunakan elektroforesis dengan bantuan sinar UV untuk mengukur pola pita DNA yang terbentuk sehingga sampel yang digunakan harus jernih dari partikel koloid dan suspensi untuk mendapatkan kemurnian DNA (Simbolon et al., 2017).

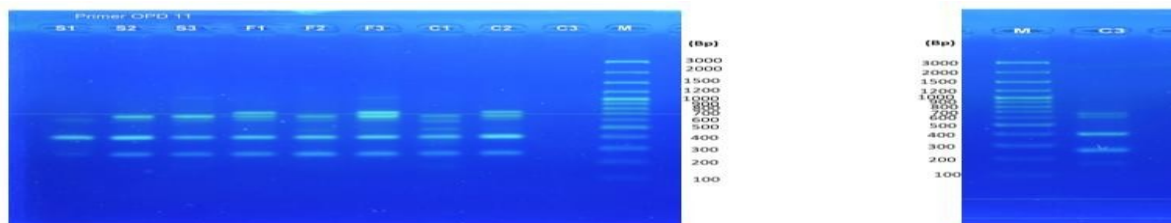
A. OPD 2



B. OPD 8



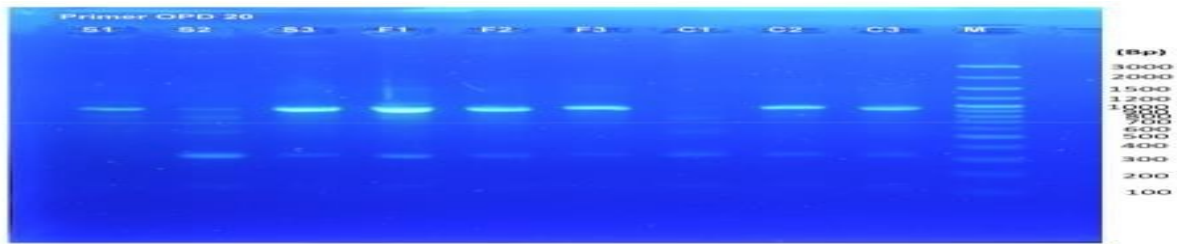
C. OPD 11



D. OPD 19



E. OPD 20



Gambar 3. Visualisasi profil RAPD polimorfisme dari 9 sampel kelapa sawit; OPD 2 dengan kode A OPD 8 dengan kode B, OPD 11 dengan kode C, OPD 19 dengan kode D, dan OPD 20 dengan kode E.

Berdasarkan hasil seleksi primer yang digunakan dalam menentukan keragaman genetik yang disajikan gambar 3 menunjukkan bahwa tidak semua primer digunakan dalam menentukan pola pita DNA. Hasil seleksi primer pada penelitian ini dapat ditemukan primer yang cocok dengan sampel DNA kelapa sawit yaitu primer OPD 2, OPD 8, OPD 11, OPD 19, dan OPD 20 yang dapat dibuktikan dengan visualisasi gambar 3. Pada primer OPD yang digunakan menunjukkan hasil polimorfik dan monomorfis pada sampel DNA. Primer yang menunjukkan hasil monomorfis ditunjukkan pada primer OPD 8 sedangkan primer yang menunjukkan hasil polimorfis ditunjukkan pada primer OPD 2, OPD 11, OPD 19 dan OPD 20. Hasil polimorfis ataupun monomorfis bisa disebabkan karena kecocokan sampel DNA dengan primer yang digunakan. Tingkat polimorfis yang tinggi untuk skoring sangat ideal agar menentukan keragaman genetiknya semakin baik.

Berdasarkan gambar 3. didapatkan pada OPD 2 pita DNA varietas Simalungun (S), First Resource (F) dan Scofindo (C) memiliki pola pita amplifikasi yang berbeda, ini mengindikasikan bahwa ketiga varietas tersebut memiliki keragaman genetik yang bervariasi. Menurut Sinaga et al., (2018) menyatakan bahwa perbedaan pola pita yang dihasilkan dapat menggambarkan keragaman genetik. Visualisasi hasil polimorfisme OPD 8 pola pita DNA varietas Simalungun (S), First Resource (F), dan Scofindo (C) memiliki pola pita amplifikasi yang banyak, ini juga mengindikasikan ketiga varietas berhasil dalam proses PCR. Hasil polimorfisme OPD 11 pola pita DNA didapatkan bahwa varietas Simalungun (S) dengan varietas First Resource (F) memiliki pola pita amplifikasi yang berbeda, ini mengindikasikan kedua varietas memiliki keragaman genetik yang bervariasi, sedangkan untuk varietas First Resource (F) dengan varietas Scofindo (C) memiliki pola pita amplifikasi yang sama.

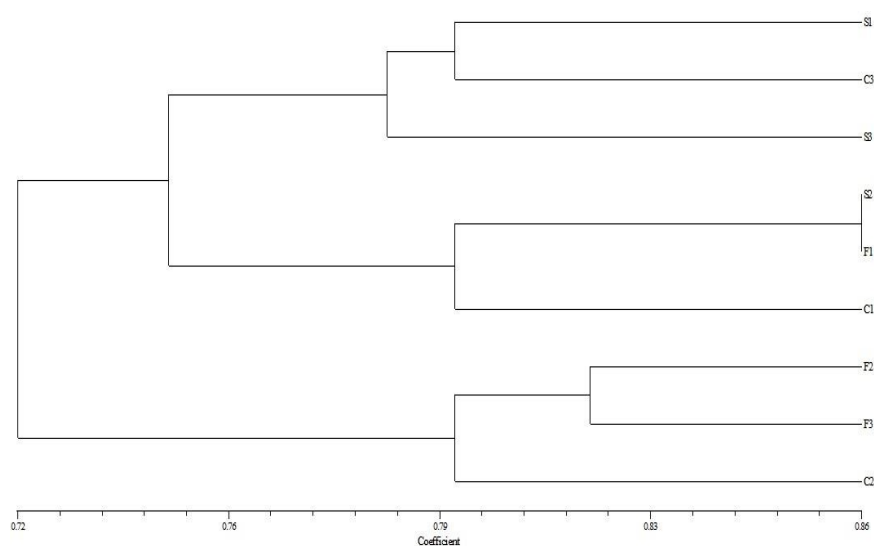
Visualisasi hasil polimorfisme OPD 19 didapatkan bahwa ketiga varietas memiliki pola pita amplifikasi yang sama, mengindikasikan memiliki keragaman genetik yang dekat.

Hasil polimorfisme OPD 20 didapatkan bahwa ketiga varietas memiliki pola pita amplikasi yang sama. Menurut Azizah (2009) dalam Sinaga et al., (2018) menyatakan bahwa hasil amplikasi yang kurang baik dapat disebabkan oleh ketidaksesuaian primer, efisiensi, dan optimasi proses PCR.

Tingkat polimorfis pada sampel DNA yang digunakan cukup tinggi sedangkan tingkat monomorfik sangat rendah. Menurut Putri, (2010) tingkat polimorfisme yang didapatkan dari analisis marka molekuler merupakan informasi yang sangat penting bagi pemulia tanaman untuk menjadi acuan dan melihat kekayaan diversitas gen. Tingkat polimorfisme DNA sangat dibutuhkan sebagai memilih marka yang mampu membedakan antar galur yang digunakan. Kelima primer yang digunakan menghasilkan pita DNA yang cukup jelas dan mempunyai keragaman pada *basepair* (bp). Berdasarkan elektroforesis hasil amplifikasi dengan menggunakan lima primer, terdapat pita-pita yang diterjemahkan kedalam bentuk data binary dengan memberi angka 1 bila terdapat pita dan jika tidak terdapat pita diberikan angka 0 (Ferreira dan Grattapaglia, 1998).

B. Grafik Dendogram

Hasil dari ekstraksi DNA dan analisis genetic menggunakan marka molekuler RAPD berupa grafik dendogram untuk mengetahui variasi genetik dari sampel daun kelapa sawit, dapat dilihat pada grafik 1.

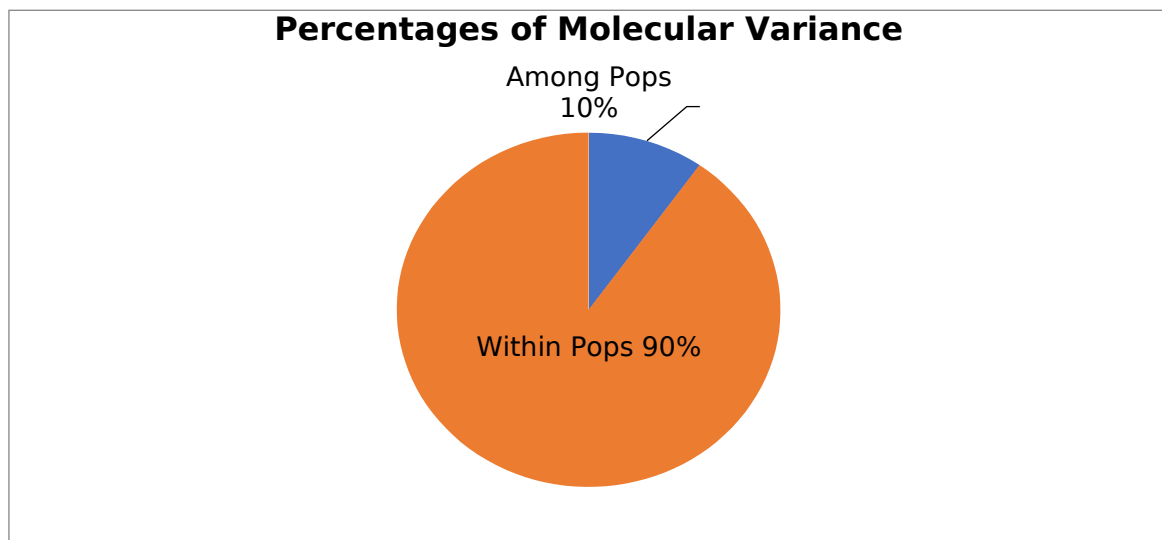


Grafik 1. Dendogram filogenetik kelapa sawit 9 individu; ; (S) varietas Simalungun, (F) varietas First Resources, (C) Socfindo.

Berdasarkan dendogram filogenetik (Grafik 1) dapat diketahui bahwa variasi genetik aksesi klon kelapa sawit, dari sembilan aksesi klon kelapa sawit dikelompokkan menjadi dua kluster. Kluster I terbagi menjadi dua subkluster yaitu IA dan IB. Subkluster IA

terdiri (S1, C3, S3) dipisahkan karena perbedaan karena toleran terhadap lahan pasang surut dan subkluster IB terdiri (S2, F1, C1) memiliki variasi genetik yang dekat (Grafik 1) dikarenakan kedua varietas tersebut berasal dari tetua dura dan pesifera. Kluster II juga terbagi menjadi dua subkluster yaitu IIA dan IIB. Subkluster IIA terdiri dari (F2, F3) dan subkluster IIB terdiri dari (C2) yang dibedakan berdasarkan persilangan tetuanya .

C. Grafik Amova



Grafik 2. Persentase data dalam populasi dan antar populasi varietas kelapa sawit.

Persentase variasi molekuler dibagi menjadi dua bagian yaitu keragaman antar populasi dan dalam populasi. Data dalam populasi yang didapat sangat tinggi yaitu mencapai 90% sedangkan data antar populasi cukup rendah yaitu 10%. Hal ini mengartikan bahwa apabila semakin tinggi presentase dalam populasi maka semakin tinggi keragaman genetik pada setiap varietas kelapa sawit. Menurut Zulhermana., (2009) semakin jauh jarak genetik suatu individu maka akan meningkatkan keberhasilan untuk persilangan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pencucian CIAA dapat mempengaruhi nilai konsentrasi, kemurnian dan kualitas DNA. Pencucian CIAA lebih dari satu kali menunjukkan nilai yang cukup baik dengan dibuktikan nilai konsentrasi dan kemurnian serta gambar kualitas DNA yang dihasilkan. Hal ini disebabkan bahan pengotor seperti protein, polisakarida dan fenol mampu mendegradasi. Persentase variasi molekuler menunjukkan variasi dalam populasi sampel sebesar 90% dan variasi antar populasi sampel sebesar 10%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2014. *Oilseeds : World Market And Trade*. United States Department Of Agriculture (USDA). Circular Series FOP 07-14.
- Anggereini, Evita. 2008. *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Suatu Metode Analisis DNA Dalam Menjelaskan Berbagai Fenomena Biologi*. Biospecies.1 (2): 73-76.
- Aulia, R., Siregar, L.A.M., Bayu, E. S., dan Setiowati, R. D. 2017. *Evaluasi Keragaman Genetik Tanaman Kelapa Sawit (Elaeis Guineensis Jacq.) Di Kebun Percobaan PPKS Berdasarkan Primer SSR (Simple Sequence Repeats)*. Jurnal Pertanian Tropik (3) : 236-239.
- Azrai, M. 2005. *Pemanfaatan Markah Molekuler Dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman*. J. Agrobiogen. (1):26-37.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2014. *Pedoman Budidaya Kelapa Sawit (Elaeis Guineensis Jacq.) Yang Baik*. Jakarta : Kementrian Pertanian.
- Fatchiyah. 2010. *DNA Qualitative & Quantitative Analysis*, <http://fatchiyah.lecture.ub.ac.id/teaching-responsibility/general/dna-qualitative-quantitative-analysis/>, diunduh 17 Februari 2021.
- GAPKI. 2020. *Implementasi B30 Telah Terlaksana, Pemerintah Langsung Kebut Ke Bauran B40 & B50*, <https://gapki.id/news/16011/implementasi-b30-telah-terlaksana-pemerintah-langsung-kebut-ke-bauran-b40-b50>, diunduh 17 Februari 2021.
- Malaysian Palm Oil Board. 2003. *Natural Palm Oil From Tropical Tradition*. www.totrienol.org/. webpage 1 [Diakses pada 17 Februari 2021].
- Mangoensoekarjo, S. dan H. Semangun. 2008. *Manajemen Agrobisnis Kelapa Sawit*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Oil World. 2020. *The Oil World Annual Report Of 2015*. Hamburg (GM): Oil World.
- Priyambodo. 2017. *Prinsip, Metode, Dan Teknik Isolasi*, **Error! Hyperlink reference not valid.** diunduh 17 Februari 2021.
- Putri NTAF. 2010. *Karakterisasi Spesies Bahan Baku Ikan Air Tawar Komersial Berbasis PCR-Sequencing Dan Perbandingan Metode Ekstraksi DNA [Skripsi]*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Rholf, F.J., 1995. *NTSYS-PC Numerical Taxonomic And Multivariate Analysis System*. Exeter Software, New York.
- Santoso, D. 2001. *Pengembangan Pelacak DNA Spesifik Gen Melalui Bioinformatika: Identifikasi Gen Penyandi Protein Biji 21 Kda Pada Kakao UAH Indonesia*. Menara Perkebunan. 69 (1): 10 – 17.
- Sari, V. K. dan Murti, R. H. 2015. *An Effective Method For DNA Extraction Of Mature Leaf Of Sapodilla (Manilkara Zapota (L.) Van Royen)*, Agrivita (37).
- Shaibu, A.A. 2012. *Genetic Diversity Analysis Of Musa Species Using Amplified Fragment Length Polymorphism And Multivariate Statistical Technique*. International Journal of Biochemistry and Biotechnology. 1 (6): 175-178.
- Sharma, Ramavtar. Santosh Sharma, Sushil Kumar. 2018. *Pair-Wise Combinations Of Rapid Primers For Diversity Analysis With Reference To Protein And Single Primer Rapid In Soybean*. Annals of Agrarian Science. 16: 243-249.
- Singh, R., L. L. Eng-Ti, L. C. L. Ooi, M. Ong- Abdullah, N. C. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, M. D. Amiruddin, R. Rosli, M. A. A. Manaf, K. L. Chan, M. A. Halim, N. Azizi, N. Lakey, S. W. Smith, M. A. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A. V. Brunt, C. Wang, J. M. Ordway, R. Sambanthamurthi, and R. A. Martienssen. 2013b. *The Oil Palm Shell Gene Controls Oil Yield And Encodes A Homologue Of SEEDSTICK*. (500) : 340–344.
- Subdirektorat Statistik Tanaman Perkebunan. 2018. *Statistik Kelapa Sawit Indonesia*

- Sulistyo B. DH., et al. 2010. *Budidaya Kelapa Sawit*. Jakarta : Balai Pustaka Badan Pusat Statistik.
- Sulistyo B. 2010. *Budidaya Kelapa Sawit*. Jakarta : Balai Pustaka.
- Ying, S. T., dan Qomaruzzaman, F. 2006. *Dna Extraction From Mature Oil Palm Leaves*. *Journal of Oil Palm Research* (18) : 219-224.
- Yuwono, T., 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Zulfahmi. 2013. *Penanda Dna Untuk Analisis Genetik Tanaman*. *Jurnal Agroteknologi* (3) : 41-52.