



## SIDIK JARI DNA MATERIAL KULTUR JARINGAN MENGGUNAKAN SSR DAN AFLP

### DNA FINGERPRINTING OF TISSUE CULTURE MATERIAL BY USING SSR AND AFLP

Sri Wening, Dian Rahma Pratiwi, Erwin Nazri, Ernayunita, dan Hernawan Yuli Rahmadi

**Abstrak** Kultur jaringan dimanfaatkan sebagai alat dalam program pemuliaan dan perbanyakan material komersial kelapa sawit. Untuk mengontrol proses kultur jaringan di laboratorium, analisis DNA dapat dilakukan dalam usaha menjamin kebenaran informasi identitas serta untuk mengetahui kestabilan genetik material pada tiap tahap proses kultur jaringan. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji ekstraksi DNA material kultur jaringan kelapa sawit serta sidik jari DNA pada material kultur pada tiap tahapan proses kultur jaringan, menggunakan 11 marka SSR dan 6 kombinasi primer selektif AFLP. Hasil menunjukkan bahwa protokol ekstraksi DNA yang dilakukan dapat digunakan untuk memperoleh DNA dengan kuantitas dan kualitas yang cukup untuk PCR-SSR dan PCR-AFLP. Profil SSR yang sama ditunjukkan pada semua cuplikan material yang dianalisis pada tiap tahap proses kultur jaringan. Terdapat variasi hasil sidik jari DNA menggunakan AFLP, dimana terdapat profil AFLP yang berbeda pada material yang sama pada tahap kalus dan eksplan, serta embrio dan ramet. Perbedaan profil DNA pada material yang sama pada tahap kultur yang berbeda tersebut menunjukkan adanya perubahan genetik material kultur yang mungkin disebabkan oleh pengaruh proses kultur jaringan. SSR dapat digunakan untuk identifikasi atau verifikasi identitas material kultur, sedangkan marka DNA yang menunjukkan ketidakstabilan genetik material kultur dapat digunakan untuk kajian lebih lanjut mengenai perubahan genetik material kultur dalam kaitannya dengan abnormalitas klon.

**Kata kunci:** sidik jari DNA, kultur jaringan, SSR, AFLP, kelapa sawit

**Abstract** Tissue culture is used as a tool in oil palm breeding programme and commercial vegetative propagation. To control tissue culture process in a laboratory, DNA analysis can be used to verify the identity information and to understand the genetic stability of each stage of tissue culture. This research aimed to study the DNA extraction of oil palm tissue culture material and DNA fingerprinting of tissue culture material at each stage of tissue culture process, by using 11 SSR markers and 6 combinations of AFLP selective primers. The results showed that the protocol of DNA extraction resulted DNA samples with good quality and quantity for SSR-PCR and AFLP-PCR. The same SSR profiles were observed at all material analyzed at each stage of tissue culture process. There were variations of AFLP profiles observed at material of explant and callus stages, as well as embryo and ramet stages. Different DNA profiles of the same material at different stages show genetic changes of culture material which probably caused by the process of tissue culture. SSR could be used for identification or verification of culture material identities, while the DNA markers which detected different DNA profiles could be used for further study of culture material genetic changes, in relation with clone abnormality.

**Keywords:** DNA fingerprinting, tissue culture, SSR, AFLP, oil palm

#### PENDAHULUAN

Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan vegetatif organisme secara *in vitro*. Teknik ini sangat berguna bagi program pemuliaan kelapa sawit, karena pada banyak kasus, terdapat beberapa kendala dalam perbanyakan kelapa sawit secara generatif (Suman,

*Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit*

Sri Wening (✉)  
Pusat Penelitian Kelapa Sawit  
Jl. Brigjen Katamsno No. 51 Medan, Indonesia  
Email: sriwening.sw@gmail.com



2017). Selain itu, teknik ini dapat dipergunakan untuk memperbanyak bahan tanaman komersial kelapa sawit unggul hasil seleksi (Corrêa *et al.*, 2016). Penggunaan bahan tanaman tersebut memiliki potensi untuk menghasilkan produksi yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan bahan tanaman unggul hasil perbanyakan secara persilangan (Kushairi *et al.*, 2010; Zulkifli *et al.*, 2017).

Proses kultur jaringan memanfaatkan sifat totipotensi sel organisme, karena sel somatik dapat dirangsang untuk tumbuh berdiferensiasi menjadi organ yang berbeda (Guan *et al.*, 2016). Proses pertumbuhan dan berkembang tersebut dilakukan pada media kultur jaringan yang berisi unsur-unsur hara dan zat pengatur tumbuh dengan jenis dan komposisi yang khusus untuk tiap tahapnya (Saad dan Elshahed, 2012).

Proses kultur jaringan kelapa sawit memerlukan waktu hingga dua tahun atau lebih untuk menghasilkan planlet (tanaman baru hasil kultur jaringan) (Corley dan Tinker, 2016). Proses kultur jaringan juga memerlukan tenaga ahli yang terampil, serta laboratorium yang standar (Kushairi *et al.*, 2010). Hal tersebut menyebabkan proses kultur jaringan kelapa sawit memerlukan biaya yang tidak sedikit. Material kultur yang berada di dalam laboratorium berasal dari pohon ortet yang berbeda. Selain itu, terdapat perbedaan kecepatan pertumbuhan kultur yang berbeda pada tiap kultur klon dan banyaknya teknisi yang terlibat dalam proses tersebut (Nas *et al.*, 2013). Hal tersebut menyebabkan rentannya proses kultur jaringan terhadap kejadian kultur yang tertukar/tercampur, sehingga diperlukan suatu sistem yang dapat memastikan identitas kultur di laboratorium, untuk meminimalkan kejadian tertukar/kesalahan identitas kultur.

Proses kultur jaringan kelapa sawit juga mengalami kendala berupa abnormalitas tanaman hasil kultur jaringan kelapa sawit. Abnormalitas tersebut dapat berupa kemunculan buah mantel, buah banci, bunga ekor tupai, pelepah tegak, dan berbagai macam abnormalitas morfologi tanaman yang lain (Ernayunita *et al.*, 2019; Setiowati *et al.*, 2011). Abnormalitas dapat terjadi karena proses metilasi yang dipicu oleh proses pertumbuhan kultur yang memerlukan zat pengatur tumbuh (Jaligot *et al.*, 2011), atau karena perubahan DNA. Pemberian jenis dan komposisi zat pengatur tumbuh yang tepat pada media

dapat meminimalkan kejadian abnormalitas. Untuk meminimalkan kemungkinan terjadinya abnormalitas klon kelapa sawit, maka diperlukan sistem untuk mengawasi kestabilan genetik kultur pada tiap tahap proses kultur jaringan.

Analisis DNA dapat digunakan dalam suatu sistem untuk mengetahui identitas dan kestabilan genetik material kultur jaringan (Teixeira da Silva, 2007). Analisis tersebut dikenal sebagai sidik jari DNA (*DNA fingerprinting*). Dalam proses analisis, sidik jari DNA melibatkan penggunaan marka DNA (Kwon *et al.*, 2012). Terdapat berbagai teknik marka DNA yang telah digunakan dalam analisis sidik jari DNA tanaman, seperti *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (Khan *et al.*, 2010), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Sardaro *et al.*, 2012), *Simple Sequence Repeat* (ISSR) (Tian *et al.*, 2012), *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Koelling *et al.*, 2012) dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Fang *et al.*, 2014). Pemilihan marka DNA yang digunakan ditentukan berdasarkan tujuan analisis, ketersediaan sumber daya yang dimiliki dan akurasi yang diinginkan (Wening *et al.*, 2013). Sebelum dilakukan sidik jari DNA, diperlukan protokol ekstraksi DNA yang menghasilkan DNA yang cukup baik dalam hal kuantitas dan kualitasnya (Wening dan Yenni, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan ekstraksi DNA material kultur jaringan kelapa sawit serta untuk melakukan sidik jari DNA pada tiap tahapan proses di laboratorium material kultur jaringan, menggunakan teknik SSR dan AFLP. Hasil-hasil tersebut diharapkan akan memberikan data pada kajian penggunaan sidik jari DNA dalam sistem pengendalian proses kultur jaringan di laboratorium.

## BAHAN DAN METODE

### A. Ekstraksi DNA Material Kultur Jaringan

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Prosedur ekstraksi DNA merujuk pada protokol produsen yang dimodifikasi dengan penirisan cairan yang terdapat pada cuplikan jaringan material kultur *in vitro* (Lubis *et al.*, 2017). Perbedaan kuantitas DNA yang diperoleh dari cuplikan yang diambil dari eksplan, kalus, embrio, pupus

dan akar dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah 50 mg cuplikan tiap material yang diambil secara acak dari stok kultur yang ada, dengan 10 ulangan pada tiap jenis kultur, pada suatu waktu di Laboratorium Kultur Jaringan PPKS. Kuantitas DNA yang diperoleh pada tiap reaksi ekstraksi DNA, dilakukan menggunakan Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Analisis ragam kuantitas DNA tersebut dilakukan menggunakan bantuan perangkat lunak R (R core team, 2018). *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dilakukan

jika terdapat beda nyata antar perlakuan.

## B. Sidik Jari DNA

Ekstraksi DNA dilakukan pada 50 mg cuplikan jaringan dari tiap cuplikan klon yang diambil secara acak dari tiap tahap proses kultur jaringan (Tabel 1), menggunakan DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Ekstraksi DNA tersebut merujuk pada protokol dari produsen dengan modifikasi penirisan cairan yang terdapat pada cuplikan jaringan material kultur *in vitro* (Lubis *et al.*, 2017).

Tabel 1. Cuplikan material yang dianalisis untuk tiap klon  
Table 1. Sample of material analyzed for each clone

Kode Klon	Tahap kultur jaringan				
	Eksplan	Kalus	Embrio	Ramet	Lapangan
Klon A	A	A			
Klon B		B	B		
Klon C			C	C	
Klon D			D	D	
Klon E				E	E

Keterangan: Huruf pada tiap tahap proses kultur jaringan menunjukkan material klon yang diambil sebagai cuplikan yang dianalisis

Remark: Letter at each stage of tissue culture process shows clone material sampled for analysis

Tabel 2. Sebelas marka SSR kelapa sawit yang digunakan dalam analisis dan motif ulangnya (Billotte *et al.*, 2005)  
Table 2. Eleven oil palm SSR markers used in the analysis and their repeat motifs (Billotte *et al.*, 2005)

No	Lokus SSR	(Motif) <sub>jumlah ulangan</sub>
1.	<i>mEgCIR2347</i>	(GA) <sub>15</sub>
2.	<i>mEgCIR3775</i>	(GA) <sub>18</sub>
3.	<i>mEgCIR3691</i>	(GA) <sub>14</sub>
4.	<i>mEgCIR0783</i>	(GA) <sub>15</sub>
5.	<i>mEgCIR2224</i>	(GA) <sub>17</sub>
6.	<i>mEgCIR3213</i>	(GA) <sub>13</sub>
7.	<i>mEgCIR3400</i>	(GA) <sub>16</sub>
8.	<i>mEgCIR3311</i>	(GA) <sub>15</sub>
9.	<i>mEgCIR3555</i>	(GA) <sub>18</sub>
10.	<i>mEgCIR3546</i>	(GA) <sub>15</sub>
11.	<i>mEgCIR0782</i>	(GA) <sub>20</sub>

DNA dari tiap cuplikan dengan konsentrasi sekitar 10 ng/ $\mu$ L digunakan dalam SSR-PCR menggunakan 11 primer SSR yang dihasilkan oleh Billotte *et al.*, (2005) (Tabel 2), dengan protokol amplifikasi seperti yang diuraikan oleh Wening dan Yenni (2013). Penggunaan primer universal M13 dengan label fluoresen yang berbeda (FAM, HEX, atau NED), dikombinasikan dengan penambahan sekuen M13 pada ujung 5' tiap primer SSR dilakukan sebagai strategi agar dapat menggabungkan beberapa cuplikan menjadi satu cuplikan dalam analisis fragmen. Fragmen DNA hasil amplifikasi dianalisis menggunakan *capillary sequencer*, menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh Macrogen (Korea). Alel-alel SSR dibaca menggunakan bantuan perangkat lunak GeneMarker® version 2.4.0 (SoftGenetics LLC®; State College PA, USA) (Hulce *et al.*, 2011).

AFLP-PCR dilakukan dengan menggunakan protokol oleh Vos *et al.* (1995) yang dimodifikasi oleh Ningrum *et al.* (2014) menggunakan enam kombinasi primer selektif (EcoRI-AGG/MseI-CAA, EcoRI-AGA/MseI-CAA, EcoRI-AGG/MseI-CAC, EcoRI-AGA/MseI-CAC, EcoRI-AGG/MseI-CAG, EcoRI-ACA/MseI-CAG). Pemilihan enzim restriksi dan nukleotida tersebut merujuk pada analisis AFLP yang telah dilakukan sebelumnya pada kelapa sawit (Billotte *et al.*, 2005). Fragmen DNA hasil amplifikasi dianalisis menggunakan *capillary sequencer*, menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh Macrogen (Korea). Alel-alel AFLP dibaca menggunakan bantuan perangkat lunak GeneMarker® version 2.4.0 (SoftGenetics LLC® ; State College PA, USA) (Hulce *et al.*, 2011).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi DNA

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi DNA dari material kultur jaringan untuk mendapatkan DNA dalam jumlah yang cukup baik dalam hal kuantitas maupun kualitasnya, sehingga dapat dipergunakan dalam tahap analisis selanjutnya. Penelitian ini merupakan pengembangan publikasi yang dilakukan oleh Lubis *et al.* (2017), yang hanya melakukan ekstraksi DNA dari eksplan dan kalus. Pada penelitian ini, dilakukan ekstraksi DNA dari eksplan, kalus, embrio, ramet dan tanaman yang telah ditanam di lapangan, dengan mengkaji kuantitas dan kualitas

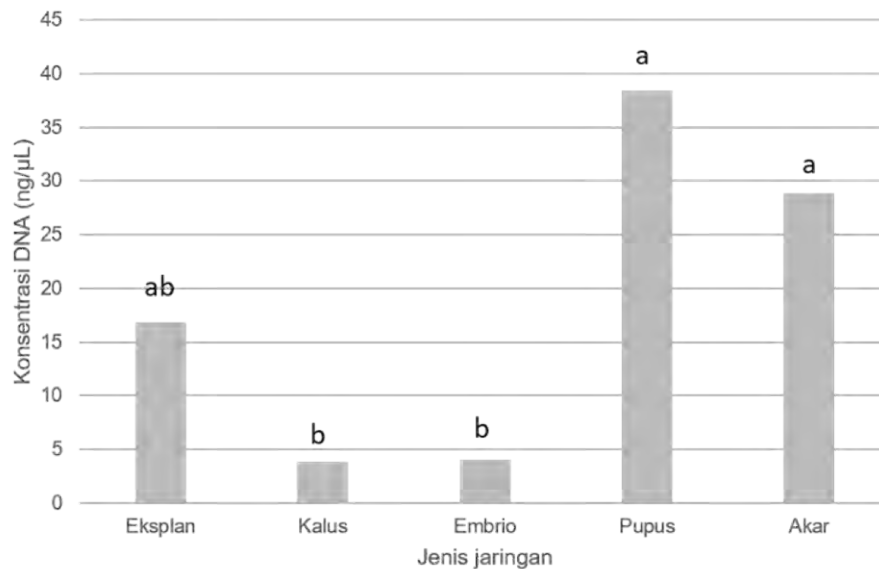
yang dihasilkannya. Ekstraksi DNA yang dilakukan menghasilkan kuantitas DNA yang berbeda-beda, tergantung pada jenis kultur yang digunakan sebagai material ekstraksi. Ekstraksi yang dilakukan terhadap pupus menghasilkan konsentrasi DNA terbanyak (38,43 ng/ $\mu$ L), sedangkan ekstraksi yang dilakukan terhadap kalus menghasilkan konsentrasi DNA terkecil (3,83 ng/ $\mu$ L). Tidak terdapat perbedaan konsentrasi DNA yang nyata pada ekstraksi DNA dari kalus, embrio dan eksplan, serta tidak terdapat perbedaan yang nyata pada ekstraksi DNA dari eksplan, pupus dan akar planlet. Sementara itu, terdapat perbedaan yang nyata antara konsentrasi DNA yang diekstraksi dari kalus dan embrio, dibandingkan dengan konsentrasi DNA yang diekstraksi dari pupus dan akar planlet (Gambar 1).

Hasil ekstraksi DNA dari material kalus lebih sedikit jika dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan oleh Pamidimarri *et al.* (2009), yang memperoleh  $88,3 \pm 3,4$   $\mu$ g/g jaringan. Penelitian tersebut menggunakan 0,1 g jaringan kalus untuk diekstraksi DNA, sementara pada penelitian ini menggunakan 0,05 g kalus. Selain itu, Pamidimarri *et al.* (2009) menggunakan protokol CTAB yang dimodifikasi. sementara protokol yang digunakan pada penelitian ini menggunakan metode kolom sentrifugasi.

Selain kuantitas yang diperoleh, kualitas DNA merupakan parameter yang mutlak diperlukan agar DNA yang diperoleh dapat dipergunakan dalam analisis DNA lanjutan. Pada penelitian ini, kualitas DNA diukur dari keberhasilan DNA untuk direaksikan dalam PCR dan dalam proses pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi. Marka DNA yang digunakan dalam sidik jari DNA pada penelitian ini adalah SSR dan AFLP, yang menggunakan proses PCR dan pemotongan enzim restriksi, sehingga, DNA yang diperoleh tersebut otomatis berkualitas baik, jika dapat digunakan dalam PCR-SSR dan PCR-AFLP.

### Sidik Jari DNA menggunakan SSR

Marka SSR yang digunakan pada penelitian adalah marka SSR yang telah dipetakan pada kromosom kelapa sawit, dengan posisi tidak saling terpaut (Billotte *et al.*, 2005, Wening dan Yenni, 2013). Analisis sidik jari DNA menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan profil SSR antar material dengan identitas klon yang sama pada tahap kultur jaringan (Tabel 3, Gambar 2, Gambar 3).



Gambar 1. Kuantitas DNA hasil ekstraksi dari berbagai jenis material kultur Huruf yang berbeda pada histogram menggambarkan perbedaan nyata ( $\alpha = 0,05$ ) berdasarkan uji Duncan (DMRT)

Figure 1. DNA quantity of DNA extraction from various type of culture material Different letter at histogram represents significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) based on Duncan test (DMRT)

Tabel 3. Hasil sidik jari DNA menggunakan SSR pada cuplikan material yang dianalisis untuk tiap klon

Table 3. Results of DNA fingerprinting using SSR for samples of material analyzed of each clone

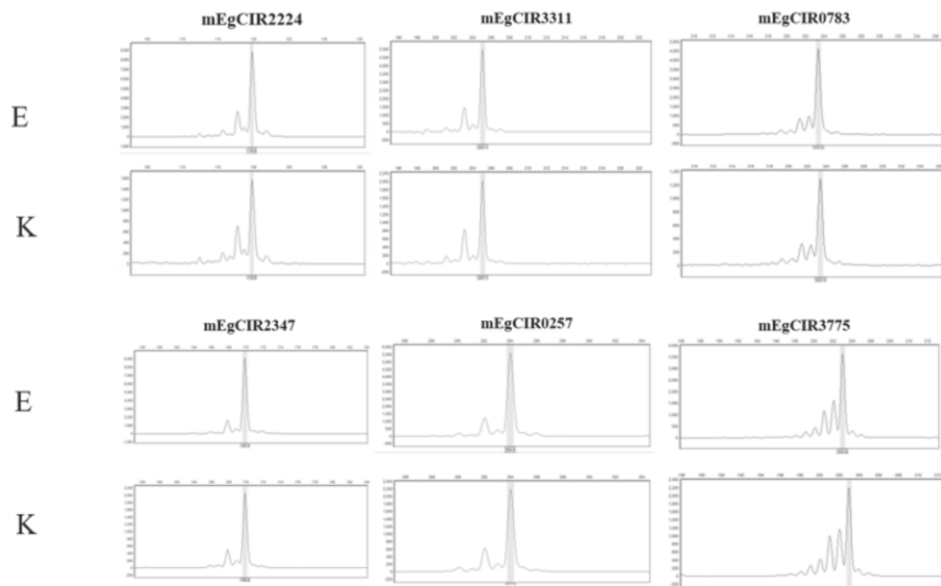
Kode Klon	Tahap kultur jaringan				
	Eksplan	Kalus	Embrio	Ramet	Lapangan
Klon A	A*	A*			
Klon B		B!	B!		
Klon C			C#	C#	
Klon D			D^	D^	
Klon E				E&	E&

Keterangan: Huruf pada tiap tahap proses kultur jaringan menunjukkan material klon yang diambil sebagai cuplikan yang dianalisis. Tanda mengikuti huruf mewakili profil SSR. Tanda yang sama menunjukkan profil SSR yang sama pada lokus yang dianalisis

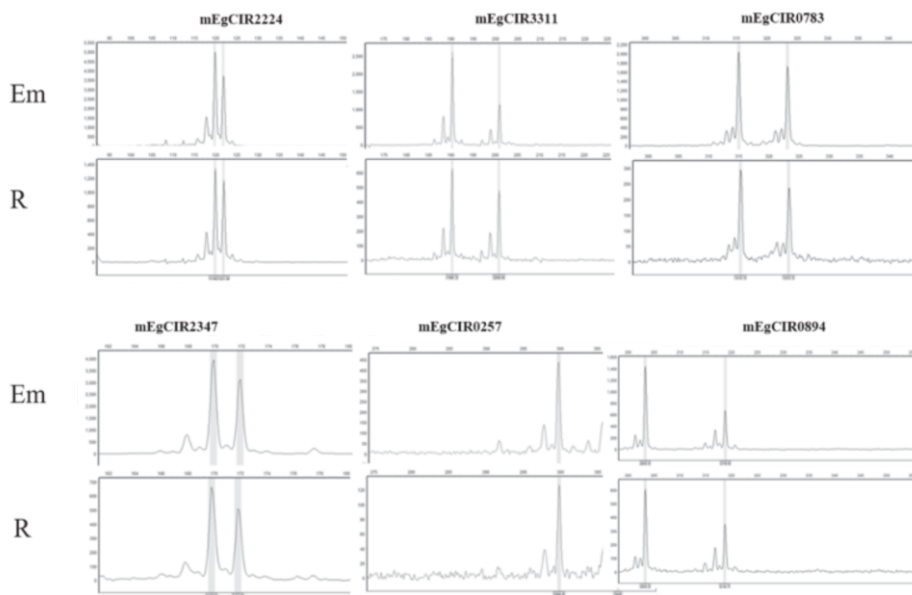
Remark: Letter at each stage of tissue culture process shows clone material sampled for analysis. Marks following the letters represent the SSR profil. The same marks show the same SSR profiles at loci analyzed

Analisis ini tidak menghasilkan data yang cukup untuk menyatakan bahwa SSR dapat digunakan untuk menyakinkan identitas antar material pada tahap yang lebih panjang, misalnya tahap eksplan ke embrio, atau tahap eksplan ke ramet. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menganalisis profil SSR pada material yang sama, dimulai dari pohon ortet di lapangan, ke tiap tahap proses

kultur jaringan (eksplan, kalus, embrio, planlet), hingga tahap ramet dan klon yang ditanam di lapangan, sehingga, dapat diketahui penggunaan SSR untuk meyakini identitas ramet yang akan ditanam di lapangan berdasarkan profil DNA pohon ortetnya, seperti penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (2007) dan Cahyaningsih *et al.* (2016).



Gambar 2. Contoh profil SSR pada eksplan (E) dan kalus (K) klon MK A  
 Figure 2. Example of SSR profiles of explant (E) and callus (K) of clone MK A



Gambar 3. Contoh profil SSR pada embrio (Em) dan ramet (R) klon MK C  
 Figure 3. Example of SSR profiles of embryo (Em) and ramet (R) of clone MK C

### Sidik Jari DNA menggunakan AFLP

Keenam primer AFLP mampu menghasilkan 14,2 lokus per klon, dengan jumlah lokus terbanyak dihasilkan oleh kombinasi primer selektif EcoRI-AGA/Msel- CAA (17,8 lokus per klon) dan paling

rendah oleh kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/Msel-CAC (10 lokus per klon) (Tabel 4). Jumlah lokus teramati tersebut lebih sedikit jika dibandingkan dengan hasil pengamatan oleh Acosta-Quezada *et al.* (2012) yang memperoleh 17,9 lokus pada tomat, yang menggunakan 11 kombinasi primer selektif.



Tabel 4. Jumlah lokus yang terbentuk oleh kombinasi primer selektif AFLP yang digunakan dalam analisis.  
 Table 4. Number of loci generated by AFLP selective primer combinations used in the analysis

No.	Primer	Rerata jumlah lokus
1	EcoRI-AGG/Msel-CAA	15,2
2	EcoRI-AGA/Msel-CAA	10
3	EcoRI-AGG/Msel-CAC	11,6
4	EcoRI-AGA/Msel-CAC	17,8
5	EcoRI-AGG/Msel-CAG	15,8
6	EcoRI-ACA/Msel-CAG	14,8

Tabel 5 dan Gambar 4 menunjukkan adanya perbedaan sidik jari DNA menggunakan AFLP, karena terdapat profil AFLP yang berbeda pada material tahap kalus dan eksplan, serta embrio dan ramet. Sementara itu, tidak terdapat perbedaan profil AFLP pada material lain yang diambil pada tahap embrio dan ramet, kalus

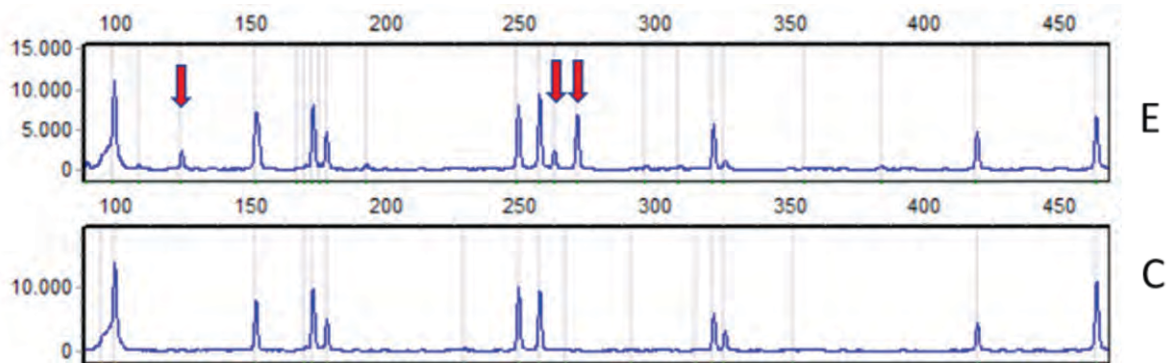
dan embrio, serta ramet dan lapangan (Gambar 5). Perbedaan profil DNA pada material yang sama pada tahap kultur yang berbeda tersebut menunjukkan adanya perubahan genetik material kultur yang mungkin disebabkan oleh pengaruh proses kultur jaringan.

Tabel 5. Profil AFLP pada cuplikan material kultur yang dianalisis pada tahap kultur jaringan tertentu  
 Table 5. AFLP profiles of culture material analyzed at certain culture stages

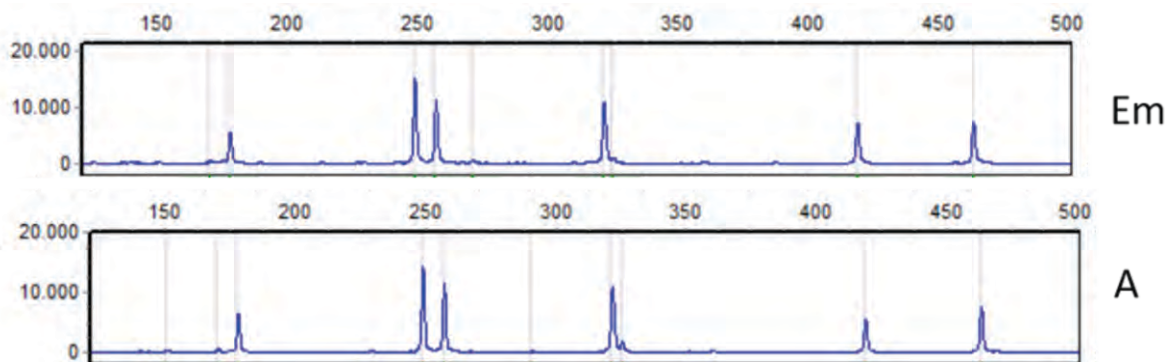
Klon	Cuplikan diambil pada tahap kultur jaringan:					Kombinasi primer selektif AFLP					
	Eksplan	Kalus	Embrio	Ramet	Lapangan	EcoRI-AGG/Msel-CAA	EcoRI-AGA/Msel-CAA	EcoRI-AGG/Msel-CAC	EcoRI-AGA/Msel-CAC	EcoRI-AGG/Msel-CAG	EcoRI-ACA/Msel-CAG
A	A	A				-	-	-	-	-	-
B		B	B			+	+	b	+	+	b
C			C	C		+	+	+	+	+	+
D			D	D		-	+	+	-	+	-
E				E	E	+	+	+	+	+	+

Keterangan: + : profil AFLP pada kedua tahap yang dianalisis sama  
 - : profil AFLP pada kedua tahap yang dianalisis berbeda  
 b : blank (gagal reaksi PCR)

Remarks: + : AFLP profiles at the two stages were the same  
 - : AFLP profiles at the two stages were different  
 b : blank (failed PCR)



Gambar 4. Contoh Profil AFLP yang tidak sama (ditunjukkan oleh tanda panah merah) yang dihasilkan kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/ MseI-CAC pada Klon A, pada tahap eksplan (E) dan kalus (C)  
Figure 4. An example of different AFLP profiles (shown by red arrows) generated by selective primer combination of EcoRI-AGG/MseI-CAC at Clone A, at explant (E) and calus (C) stages



Gambar 5. Contoh Profil AFLP yang sama pada klon C yang dihasilkan kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/MseI-CAC, pada tahap embrio (Em) dan ramet (A)  
Figure 5. An example of the same AFLP profiles of Clone C generated by selective primer combination of EcoRI-AGG/MseI-CAC at embryo (Em) and acclimatization (A) stages

### Analisis sidik jari DNA

Perubahan morfologi dan sitogenetik sering ditemukan pada material kultur *in vitro*. Tetapi seringkali perubahan pada kultur *in vitro* tersebut sulit dikenali secara langsung. Oleh karena itu, diperlukan analisis sidik jari DNA material kultur jaringan menggunakan marka molekuler. Selain untuk mengetahui stabilitas genetik material, sidik jari DNA tersebut bermanfaat untuk meyakini identitas material (Kaçar dan Teixeira da Silva, 2006, Teixeira da Silva, 2007).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh dari protokol ekstraksi yang digunakan memiliki kuantitas dan kualitas yang cukup untuk proses PCR-SSR dan PCR-AFLP. Hal ini ditunjukkan

oleh berhasilnya proses pemotongan DNA cuplikan dengan enzim restriksi pada AFLP, dan berhasilnya amplifikasi pada SSR dan AFLP.

Penelitian ini merupakan pengembangan dari kajian Wening *et al.* (2017) yang hanya menggunakan SSR sebagai teknik marka DNA dan material kultur jaringan yang hanya berasal dari tahap eksplan dan kalus. SSR dan AFLP merupakan marka DNA yang bersifat dapat diandalkan, sehingga sesuai untuk kajian sidik jari DNA material kultur jaringan. Kedua marka tersebut telah digunakan sebagai teknik marka DNA dalam identifikasi genotipe dan analisis keragaman genetik (Sardaro *et al.*, 2012; Perera *et al.*, 2012). Selain itu, primer SSR kelapa sawit yang telah dipublikasi (Billotte *et al.*, 2005), protokol PCR-



SSR yang telah digunakan secara terus menerus (Wening dan Yenni, 2013), serta informasi primer dan protokol AFLP yang telah dipublikasi (Vos *et al.*, 1995; Ningrum *et al.* 2014) merupakan nilai tambah, karena tidak perlu dilakukan tahap pengembangan terlebih dahulu. Pada sisi lain, kedua marka tersebut saling melengkapi, karena marka SSR bersifat kodominan, sedangkan AFLP bersifat dominan. Ditinjau dari jumlah lokus yang dihasilkan per pasangan primer, SSR menghasilkan pengamatan pada satu lokus, sedangkan AFLP menghasilkan pengamatan pada banyak lokus. Di sisi lain, protokol AFLP memiliki tahapan protokol yang lebih panjang jika dibandingkan dengan SSR.

Marka DNA yang menghasilkan profil yang sama pada material dengan identitas yang sama, berpotensi menjadi marka yang dapat digunakan untuk meyakini identitas material kultur jaringan, untuk menghindari kesalahan pelabelan atau tertukarnya material pada proses kultur jaringan (Lim dan Rao, 2005). Marka DNA yang menghasilkan profil yang berbeda pada material dengan identitas yang sama, berpotensi menjadi marka yang dapat digunakan untuk mengenali kestabilan genetik material selama proses kultur jaringan.

Marka SSR yang digunakan menghasilkan profil DNA yang sama antar material dengan identitas klon yang sama pada tahap kultur jaringan yang diambil sebagai cuplikan. Hal ini menunjukkan bahwa marka SSR tersebut berpotensi menjadi marka yang dapat digunakan untuk meyakini identitas material kultur jaringan karena menghasilkan profil yang sama pada material dengan identitas yang sama, karena jika material tersebut merupakan material yang berbeda, maka profil DNanya akan sangat jauh berbeda (Singh *et al.*, 2007). Disini dilaporkan juga bahwa ramet kelapa sawit yang dianalisis dengan menggunakan 12 lokus SSR memiliki profil yang sama dengan ortetnya.

AFLP berpotensi menjadi marka yang dapat digunakan untuk mengenali kestabilan genetik material selama proses kultur jaringan karena mampu mengenali profil DNA yang berbeda pada material dengan identitas yang sama. Di sisi lain, perbedaan DNA tersebut tidak terdeteksi oleh marka SSR yang digunakan pada penelitian ini. Hal ini sejalan dengan pernyataan Lim dan Rao (2005) dan hasil kajian Tiwari *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa AFLP merupakan metode yang lebih baik dibandingkan

dengan SSR, untuk mengenali kestabilan genetik kultur in vitro kentang.

Adanya perubahan profil DNA yang dapat dikenali oleh AFLP tersebut membuktikan bahwa proses kultur jaringan dapat menyebabkan perubahan genetik atau epigenetik yang berpotensi menimbulkan adanya perubahan fenotipe (Vazquez dan Linacero, 2010). Secara teori, seharusnya SSR merupakan marka yang peka terhadap perubahan genetik yang disebabkan oleh proses metilasi, karena SSR merupakan marka DNA pada daerah genom yang motif DNanya berulang, dan proses metilasi banyak terjadi pada daerah tersebut. Perubahan genetik dapat disebabkan oleh peristiwa metilasi DNA, karena metilasi akan menghambat proses sintesis DNA (Erich dan Wang, 1981). Ketidakmampuan SSR dalam mengenali perubahan genetik, jika dibandingkan dengan AFLP, kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kemampuan kedua marka tersebut dalam menghasilkan jumlah lokus yang diamati.

Untuk menggunakan SSR dalam protokol sidik jari DNA guna mengenali perubahan genetik, diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan jumlah marka SSR dan cuplikan material yang lebih banyak. Cahyaningsih *et al.* (2016) menyatakan dalam sidik jari DNA ramet terhadap ortetnya dengan menggunakan jumlah marka SSR yang lebih banyak (20 marka), terdapat 5 - 55% ramet yang berbeda profil DNA-nya dengan pohon ortetnya masing-masing. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh adanya perubahan genetik selama proses kultur jaringan, atau adanya kesalahan pelabelan material.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil menunjukkan bahwa protokol ekstraksi DNA yang dilakukan dapat digunakan untuk memperoleh DNA dengan kuantitas dan kualitas yang cukup untuk PCR-SSR dan PCR-AFLP. Profil SSR yang sama ditunjukkan pada semua cuplikan material yang dianalisis pada tiap tahap proses kultur jaringan, sehingga SSR dapat digunakan untuk keperluan meyakini identitas material. Terdapat perbedaan hasil sidik jari DNA menggunakan AFLP, karena terdapat profil AFLP yang berbeda pada material yang sama pada tahap kalus dan eksplan, serta embrio dan ramet.

Kajian lanjutan sidik jari DNA material kultur jaringan perlu dilakukan untuk semua tahap kultur



jaringan, dimulai dari pohon ortet hingga hasil tanaman baru yang ditanam di lapangan. Hal ini untuk mengetahui marka DNA yang berpotensi digunakan untuk membuktikan identitas klon secara menyeluruh di semua tahap proses kultur jaringan. Lebih lanjut, marka DNA yang dapat mengenali perubahan genetik dapat digunakan dalam kajian penyebab abnormalitas klon kelapa sawit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acosta-Quezada, P.G., S. Vilanova, J.B. Martínez-Laborde, J. Prohens. 2012. Genetic diversity and relationships in accessions from different cultivar groups and origins in the tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Euphytica*. 187:87-97. DOI 10.1007/s10681-012-0736-7.
- Billotte, N., N. Marseillac, A.M. Risterucci, B. Adon, P. Brottier, F.C. Baurens, R. Singh, A. Herran, H. Asmady, C. Billot, P. Amblard, T. Durand-Gasselin, B. Courtois, D. Asmono, S.C. Cheah, W. Rohde, E. Ritter, A. Charrier. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics*. 110(4): 754-765. DOI 10.1007/s00122-004-1901-8.
- Cahyaningsih, Y.F., N.M.A. Wiendi, N. Toruan-Mathius. 2016. Deteksi kestabilan genetik ramet kelapa sawit hasil kultur *in vitro* menggunakan SSR. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 44(1): 83-90.
- Corley, R.H.V., P.B. Tinker. 2016. *The Oil Palm*. Edisi kelima. Wiley Blackwell.
- Corrêa T.R., S.Y. Motoike, A.P.S. Andrade, S.M. Coser, V. Queiroz, M.M.C. Granja, D.D.N. Caetano, C.N.M. Pena, E.A.T. Picoli. 2016. Accelerated *in vitro* propagation of elite oil palm genotypes (*Elaeis guineensis* Jacq.) by substituting cytokinin with putrescine. *African Journal of Biotechnology*. 15(50): 2767-2775.
- Ehrlich, M., R.Y.H. Wang. 1981. 5-Methylcytosine in Eukaryotic DNA. *Science*. 212: 1350-1356.
- Ernayunita, H. Rahmadi, Y. Yenni, R.D. Setiowati, I.Y. Harahap. 2019. Vegetative characterization to identify oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantlet abnormalities. *AIP Conference Proceedings*. Vol. 2099. No. 1. AIP Publishing LLC, 2019.
- Fang, W.P., L.W. Meinhardt, H.W. Tan, L. Zhou, S. Mischke, D. Zhang. 2014. Varietal identification of tea (*Camellia sinensis*) using nanofluidic array of single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *Horticulture Research* 1. 14035. doi:10.1038/hortres.2014.35
- Guan, Y., S.G. Li, X.F. Fan, Z.H. Su. 2016. Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontier in Plant Science*. 7:398. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>.
- Hulce, D., X. Li, T. Snyder-Leiby, C.S. Johathan Liu. 2011. GeneMarker® Genotyping Software: Tools to Increase the Statistical Power of DNA Fragment Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 22(Suppl), S35–S36.
- Jaligot, E., S. Adler, E. Debladis, T. Beule, F. Richaud, P. Ilbert, E.J. Finnegan, A. Rival. 2011. Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 108(8): 1453-1462. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq266>.
- Kaçar, Y.A., J.A. Teixeira da Silva. 2006. *Molecular Markers in Plant Tissue Culture*. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Advances and Topical Issues Volume II. Teixeira da Silva, J. A (ed).
- Khan, S., K.J. Mirza, M.Z. Abidin. 2010. Development of RAPD markers for authentication of medicinal plant *Cuscuta reflexa*. *Eurasian Journal of Biosciences*. 4. 1-7. DOI: 10.5053/ejobios.2010.4.0.1.
- Koelling J., M.C. Coles, P.D. Matthews, A. Schwekendiek. 2012. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. *Molecular Breeding*. 30(1): 479–484. DOI 10.1007/s11032-011-9637-z.
- Kushairi, A., A.H. Tarmizi, I. Zamzuri, M. Ong-Abdullah, R. Samsul Kamal, S.E. Ooi, N. Rajanaidu. 2010. Production, performance, and advances in oil palm tissue culture. *International Seminar on Advances in Oil*

- Palm Tissue Culture. Yogyakarta: Indonesia.
- Kwon, S.J., M.J. Truco, J. Hu. 2012. LSGermOPA, a custom OPA of 384 EST-derived SNPs for high-throughput lettuce (*Lactuca sativa* L.) germplasm fingerprinting. *Molecular Breeding* 29:887–901. DOI: 10.1007/s11032-011-9623-5.
- Lim, C.C., V. Rao. 2005. DNA fingerprinting of oil palm – choice of tissues. *Journal of Oil Palm Research* 17. 136-144.
- Lubis, H.F., S. Wening, Ernayunita. Protokol ekstraksi DNA material kultur jaringan. Poster yang dipresentasikan pada Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2017. PPKS. Surakarta.
- Nas, M.N., Y. Bölek, N. Sevgin. 2013. Shortcut to long-distance developing of a tissue culture medium: micropropagation of mature almond cultivars as a case study. *Turkish Journal of Botany*. 37: 1134-1144. doi:10.3906/bot-1302-49.
- Ningrum, D.A., S. Wening, S. Hanum. 2014. Screening of AFLP Primers for Molecular Variability Test in Wild Type Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Cameroon. 2014 International Oil Palm Conference. Nusa Dua, Bali. IOPRI.
- Pamidimarri, D.V.N., Meenakshi, R. Sarkar, G. Boricha, M.P. Reddy. 2009. A simplified method for extraction of high quality genomic DNA from *Jatropha curcas* for genetic diversity and molecular marker studies. *Indian Journal of Biotechnology*. 8: 187-192. URL : <http://www.niscair.res.in>
- Perera, M.F., M.E. Arias, D. Costilla, A.C. Luque, M.B. García, C.D. Romero, J. Racedo, S. Ostengo, M.P. Filippone, M.I. Cuenya, A.P. Castagnaro. 2012. Genetic diversity assessment and genotype identification in sugarcane based on DNA markers and morphological traits. *Euphytica* 185:491-510. DOI 10.1007/s10681-012-0661-9.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Saad, I.M., A.M. Elshahed. 2012. Plant tissue culture media. Dalam: Recent advances in plant in vitro culture. Editor: Leva, A. London: IntechOpen.
- Sardaro, M.L.S., M. Atallah, M. E. Picarella, B. Aracri, M. A. Pagnott. 2012. Genetic diversity, population structure and phylogenetic inference among Italian Orchids of the Serapias genus assessed by AFLP molecular markers. *Plant Systematics and Evolution*. 298:1701–1710. DOI: 10.1007/s00606-012-0671-z.
- Setiowati, R.D., Ernayunita, A.F. Simamora, E. Nazri, Fakhrullah, T.C. Hidayat, I.Y. Harahap. 2011. Keragaan klon kelapa sawit PPKS di beberapa kebun komersil. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 19(3): 101-108.
- Singh, R., J. Nagappan, S.G. Tan, J.M. Panandam, S.C. Cheah. 2007. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for oil palm and their application in genetic mapping and fingerprinting of tissue culture clones. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 15(3): 121-131.
- Suman, S. 2017. Plant tissue culture: a promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochemical and Cellular Archives*. 17(1): 1-26. <http://rels.110mb.com>.
- Teixeira da Silva, J.A., H. Bolibok, M. Rakoczy-Trojanowska. 2007. Molecular Markers in Micropropagation, Tissue Culture and In Vitro Plant Research. *Genes, Genomes and Genomics*. 1. 66 - 72. [http://globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/GGG\\_1\(1\)/GGG\\_1\(1\)66-72o.pdf](http://globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/GGG_1(1)/GGG_1(1)66-72o.pdf)
- Tian, B., H.-Q. Yang, K.-M. Wong, A.-Z. Liu, Z.Y. Ruan. 2012. ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59. 901–908. DOI: 10.1007/s10722-011-9732-3
- Tiwari, J.K., P. Chandel, S. Gupta, J. Gopal, B.P. Singh, V. Bhardwaj. 2013. Analysis of



- genetic stability of in vitro propagated potato microtubers using DNA markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 19(4):587-595. DOI: 10.1007/s12298-013-0190-6
- Vazquez, A.M., R. Linacero, R. 2010. Stress and somaclonal variation. In: Pua E-C, Davey MR (eds) *Plant developmental biology: biotechnological perspectives*. Springer, Heidelberg.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.
- Wening, S., Ernayunita, H.Y. Rahmadi. 2017. DNA fingerprinting for identity verification of oil palm tissue culture material. PIPOC. Kuala Lumpur. 2017.
- Wening, S., R. Faizah, Y. Yenni, A.R. Purba. 2013. Aplikasi Sidik Jari DNA dalam Manajemen Plasma Nutfah Kelapa Sawit. *Prosiding Peretemuan Teknis Kelapa Sawit 2013*. Jakarta.
- Wening, S., Y. Yenni, Y. 2013. Optimasi Analisa Sidik Jari DNA Kelapa Sawit. *Prosiding Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013*. Jakarta.
- Zulkifli, Y, A. Norziha, M.H. NAqiuddin, A.M. Fadila, A.B. Nor Azwani, M. Suzana, K.R. Samsul, M. ong-Abdullah, R. Singh, K.A.P. Ghulam, A. Kushairi. 2017. Designing the oil palm of the future. *Journal of Oil Palm Research*. 29(4): 440-455. <https://doi.org/10.21894/jopr.2017.00015>