

PENYARINGAN MARKA AFLP UNTUK IDENTIFIKASI TOLERANSI KELAPA SAWIT TERHADAP GANODERMA MENGGUNAKAN METODE BSA

SCREENING OF AFLP MARKERS FOR IDENTIFICATION OF OIL PALM TOLERANCE TO GANODERMA BY USING BSA METHOD

Sri Wening, Agus Eko Prasetyo, Agus Susanto, Yurna Yenni, dan Abdul Razak Purba

Abstrak Penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Ganoderma boninense* adalah penyakit penting pada kelapa sawit di Indonesia. Pemuliaan untuk menghasilkan bahan tanaman kelapa sawit yang toleran terhadap penyakit tersebut, serta kajian patogenisitas *Ganoderma* memerlukan marka DNA yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tanaman kelapa sawit yang toleran terhadap *Ganoderma*. Pada penelitian ini, dilakukan penyaringan marka *Amplified Fragment Length Polymerase* (AFLP) untuk identifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma* menggunakan metode *Bulked Segregant Analysis* (BSA). Tanaman rentan dan toleran yang diidentifikasi melalui inokulasi buatan dengan *G. boninense* di pembibitan digunakan pada BSA-AFLP untuk menemukan DNA yang polimorfik. Diperlukan optimasi untuk memperoleh profil DNA hasil gabungan DNA tanaman contoh yang banyak. Hasil menunjukkan bahwa penggabungan DNA dari 5 hingga 15 individu tanaman menghasilkan profil AFLP yang jelas. Telah diidentifikasi satu kandidat marka DNA melalui BSA-AFLP dari hasil penyaringan menggunakan 6 kombinasi primer selektif.

Kata kunci : kelapa sawit, AFLP, BSA-AFLP, *Ganoderma*

Abstract Basal stem rot disease caused by *Ganoderma boninense* is an important oil palm disease in Indonesia. Breeding for oil palm planting material

tolerant to the disease and study of *Ganoderma* pathogenesis need DNA markers which could be used in identification of oil palm which is tolerant to *Ganoderma*. In this research, screening for *Amplified Fragment Length Polymerase* (AFLP) markers was done for identification of oil palm tolerant to *Ganoderma* by using *Bulked Segregant Analysis* (BSA) method. Susceptible and tolerant materials identified by artificial inoculation of *G. boninense* in the nursery was used to find polymorphism between susceptible and tolerant DNA. An optimization was done to obtain clear DNA profiles of high number of bulked samples. The result showed that bulking of DNA of 5 up to 15 individuals resulted clear AFLP profiles. There was a DNA marker candidate identified by BSA-AFLP after screening using six selective primer combinations.

Keywords : oil palm, AFLP, BSA-AFLP, *Ganoderma*

PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Ganoderma boninense* adalah penyakit kelapa sawit penting di Indonesia. Penyakit ini menyebabkan kerugian besar dan sangat sulit untuk dikendalikan. Salah satu pendekatan pengendalian adalah penggunaan bahan tanaman kelapa sawit yang toleran terhadap *Ganoderma* (Susanto, 2009; Susanto *et al.*, 2011).

Saat ini, sedang dikembangkan uji inokulasi buatan terhadap beberapa populasi kelapa sawit untuk mengkaji tingkat toleransi populasi tersebut terhadap serangan *G. boninense* dan untuk program pemuliaan yang menghasilkan bahan tanaman toleran terhadap *Ganoderma* (Setiawati *et al.*, 2010). Data yang dikoleksi dari uji tersebut adalah data morfologi, yang sangat terpengaruh oleh lingkungan dan tidak

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

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

mewakili karakter genetik secara rinci. Uji tersebut juga memerlukan waktu yang cukup lama dan lahan yang luas. Dibutuhkan marka DNA yang dapat digunakan untuk pengidentifikasi, yang tidak terpengaruh oleh faktor lingkungan, dan tidak memerlukan waktu yang lama seperti pada uji inokulasi buatan.

Salah satu pendekatan yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi marka yang terpaut dengan toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma* adalah dengan melakukan *Bulked Segregant Analysis* (BSA). BSA adalah analisis identifikasi korelasi antara adanya marka DNA dengan suatu sifat fenotipik tertentu, dengan cara memisahkan populasi ke dalam kelompok yang berbeda, sesuai dengan perbedaan sifat fenotipik tersebut (Becker *et al.*, 2011). Gagasan dasar keberhasilan metode BSA untuk identifikasi marka adalah individu yang memiliki perbedaan fenotipe yang kontras seharusnya memiliki perbedaan genotipe yang tajam (Wang *et al.*, 2013). Metode ini pernah digunakan untuk mengkaji ketahanan tanaman terhadap penyakit pada padi (Cheema *et al.*, 2008), lettuce (Michelmore *et al.*, 1991) dan *Arabidopsis* sp. (Becker *et al.*, 2011). Pada kelapa sawit, metode BSA pernah dilakukan oleh Ying (2005) untuk identifikasi marka DNA yang terpaut dengan warna kulit buah dan Morcillo *et al.* (2013) pada kajian identifikasi gen lipase.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) telah digunakan secara luas pada tanaman sebagai metode marka molekuler, antara lain untuk analisis sidik jari DNA, pemetaan genetik dan identifikasi gen (Aitken *et al.*, 2005; Sardaro *et al.*, 2012; Morcillo *et al.*, 2013). AFLP memiliki beberapa kelebihan yaitu: dapat dipercaya, tingkat polimorfisme yang tinggi, jumlah informasi lokus yang diperoleh tinggi setiap satu kali reaksi, menggunakan teknik PCR yang mudah dan murah, serta tanpa diperlukannya informasi latar belakang genom yang berhubungan dengan sifat fenotipe yang diamati, sehingga telah berhasil digunakan untuk mencapai tujuan pada beberapa analisis DNA (Benor *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2012; Paun dan Schönswetter, 2012). AFLP telah digunakan pada analisis sidik jari DNA kelapa sawit, seperti yang telah dilaporkan oleh Purba *et al.* (2000) dan Wening *et al.* (2009).

Pada BSA, perlu diketahui jumlah contoh yang dapat digabungkan untuk memperoleh profil marka yang jelas dan mudah terbaca. Semakin banyak jumlah contoh yang bisa digabungkan pada analisis tersebut, maka semakin efisien analisis yang dilakukan. Sementara itu, AFLP adalah teknik marka molekuler yang menghasilkan banyak lokus (multilokus). Semakin banyak jumlah contoh yang digabung akan beresiko sulitnya pembacaan profil. Berlatar belakang pada uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi protokol *Bulked Segregant Analysis – Amplified Fragment Length Polymorphism* (BSA-AFLP), sehingga diperoleh protokol yang menghasilkan profil yang jelas dengan jumlah contoh yang banyak dan menggunakannya untuk skrining marka DNA yang dapat digunakan untuk mendeteksi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*.

BAHAN DAN METODE

Dari satu keturunan yang telah dilakukan uji inokulasi buatan menggunakan *G. boninense* (Susanto *et al.*, 2013), diambil contoh 15 individu yang menunjukkan gejala penyakit *Ganoderma* (selanjutnya disebut sebagai contoh tanaman rentan) dan 15 individu yang tidak menunjukkan gejala penyakit *Ganoderma* (selanjutnya disebut sebagai contoh tanaman toleran). Ekstraksi DNA dari daun muda masing-masing tanaman dilakukan dengan menggunakan Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, 2006). Kemudian, dilakukan *Bulked Segregant Analysis* (BSA) seperti yang dilakukan oleh Ying (2005) dengan modifikasi. Perlakuan yang dilakukan adalah penggabungan DNA (individu contoh nomor 1 hingga 5, nomor 1 hingga 10 dan nomor 1 hingga 15, pada masing-masing contoh tanaman rentan dan toleran. Perbandingan volume DNA tiap individu sama dengan konsentrasi masing-masing sampel adalah 10 ng/µl.

Proses AFLP untuk tiap penggabungan contoh DNA menggunakan protokol Vos *et al.* (1995) yang dimodifikasi, seperti yang diuraikan oleh Ningrum *et al.* (2014). Protokol tersebut diaplikasikan pada masing-masing perlakuan penggabungan DNA. Tahapan pada protokol AFLP tersebut adalah sebagai berikut:

1. Pemotongan DNA genom: setiap campuran terdiri dari 9,75 µl DNA, 0,3 µl EcoRI (15 U/µl) (Invitrogen), 0,5 µl Tru9I (10 U/µl) (Promega), 0,6525 µl buffer F (10x), 0,0725 µl buffer H (10x) dan 0,0725 µl 0,5% BSA (buffer dan BSA tersedia bersama dengan masing-masing enzim restriksi). Total larutan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C, kemudian diinkubasi pada suhu 70°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu kamar.
2. Ligasi adaptor dengan fragmen DNA hasil pemotongan: adaptor EcoRI dan Tru9I dipanaskan masing-masing pada suhu 95°C selama 5 minutes, kemudian didinginkan perlahan hingga suhu kamar. DNA genom hasil pemotongan kemudian diligasi dengan adaptor dengan mencampur DNA hasil pemotongan dengan adaptor dalam reaksi yang terdiri dari 1,25 µl EcoRI adaptor (Invitrogen), 1,25 µl Tru9I adaptor (Invitrogen), 1,25 µl T4 DNA ligase (1 U/µl) (Invitrogen), 2,4 µl T4 DNA ligation buffer (5x) (Invitrogen) dan 5,85 µl PCR grade water (Invitrogen). Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 20°C selama 2 jam dan kemudian disimpan pada 4°C hingga akan digunakan. Produk ligase diencerkan 10 kali dengan *ultrapure destillet water* (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
3. Pre-amplifikasi produk ligasi: satu reaksi amplifikasi terdiri dari 2 µl produk ligasi, 14,76 µl pre-amplification primer mix (Invitrogen), 2 µl PCR buffer (10x), 1,2 µl MgCl₂ (25 mM), dan 0,04 µl BioTaq DNA polymerase (Bioline). PCR buffer dan MgCl₂ tersedia bersama dengan taq polymerase. PCR dilakukan pada mesin C1000 Touch Cycler (BioRad), dengan program: 20 siklus pada 94°C selama 30 detik, 56°C selama 1 menit dan 72°C selama 1 menit. Hasil pre-amplifikasi diencerkan 50 kali dengan *Ultrapure destillet water* (Invitrogen) untuk tahap berikutnya.
4. Amplifikasi selektif: Satu reaksi terdiri dari 0,1 µl BioTaq DNA polymerase (Bioline), 0,8 µl primer selektif Tru9I (5 µM) (Sigma), 0,8 µl primer selektif EcoRI (5 µM) (Sigma), 2 µl hasil pre-amplifikasi yang sudah diencerkan, 13,3 µl *ultrapure destillet water* (Invitrogen), 0,4 µl dNTPs (10 mM) (Promega), 2 µl NH₄ reaction buffer (10x) dan 0,6 µl MgCl₂ (50 mM). NH₄ reaction buffer dan MgCl₂ tersedia bersama dengan taq polymerase. PCR

menggunakan mesin C1000 Touch Cycler (BioRad), dengan program: 94°C selama 2 menit, 13 siklus pada 94°C selama 30 detik, 65°C (annealing temperature) selama 30 detik dan 72°C selama 1 menit, dan menurunkan suhu penempelan sebesar 0,7°C setiap siklus. Tahap ini kemudian diikuti oleh 23 siklus pada 94°C selama 30 detik, 56°C selama 30 detik dan 72°C selama 1 menit, kemudian 72°C selama 5 menit.

Enam kombinasi primer selektif digunakan untuk penyaringan, yaitu EcoRI-AGG/Msel-CAC, EcoRI-ACA/Msel-CAG, EcoRI-ACA/Msel-CTT, EcoRI-AGG/Msel-CAG, EcoRI-AGA/Msel-CTT dan EcoRI-AGA/Msel-CAC. Primer selektif EcoRI diberi label fluoresen yang berbeda sehingga hasil amplifikasi dengan label yang berbeda dapat digabung sebagai satu contoh pada analisis fragmen menggunakan *capillary sequencer* (Wening dan Yenni, 2013), menggunakan jasa yang disediakan secara komersial oleh 1stBASE (Malaysia). Profil AFLP pada contoh rentan dan toleran dibandingkan menggunakan perangkat lunak GeneMarker[®] version 2.4.0 (SoftGenetics LLC[®]), untuk perbandingan jumlah individu yang DNA-nya digabung pada protokol BSA-AFLP, dan untuk mengidentifikasi polimorfisme antara contoh tanaman rentan dan toleran, sebagai kandidat marka untuk identifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*.

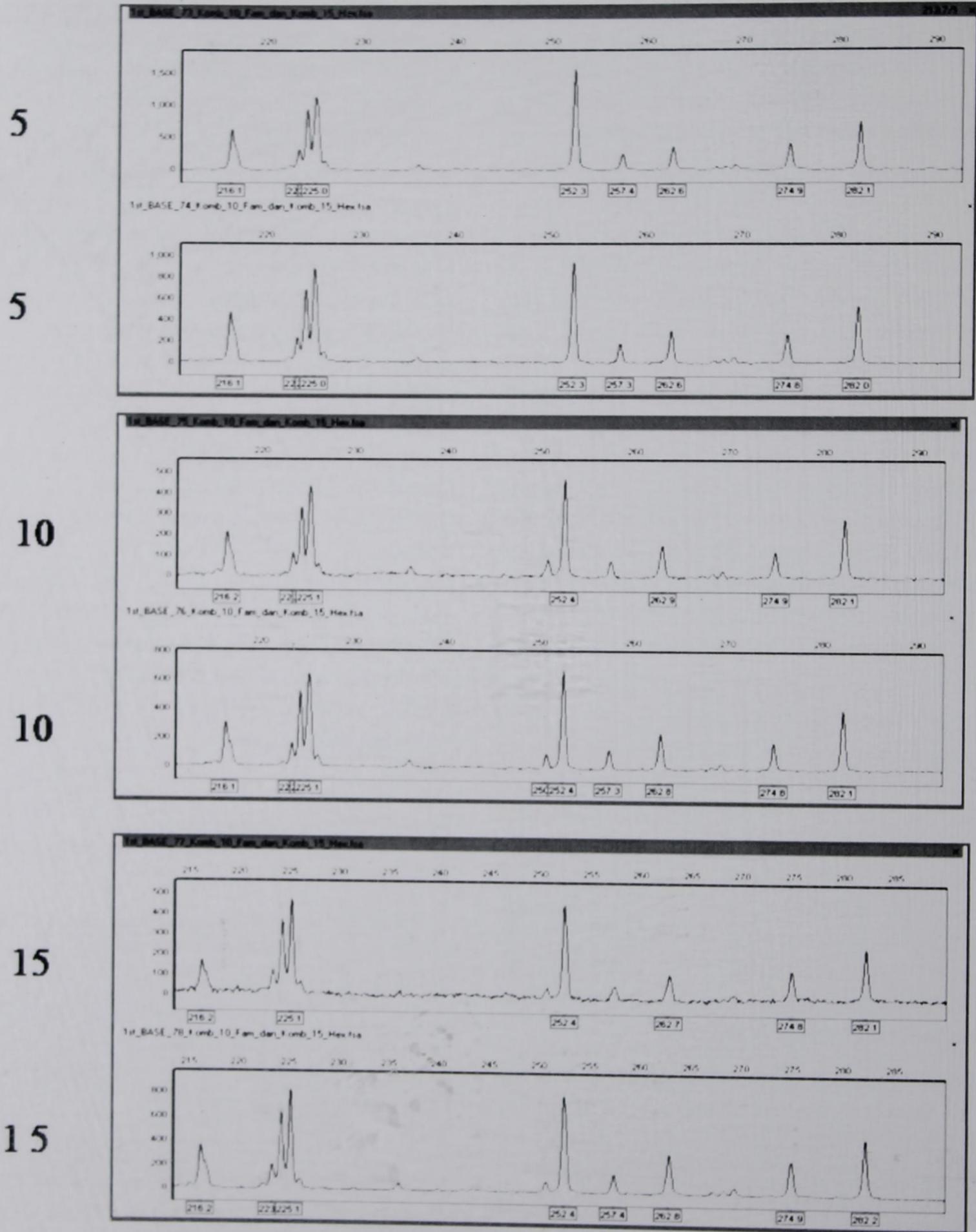
HASIL DAN PEMBAHASAN

Protokol BSA-AFLP

Enam kombinasi primer yang digunakan pada kajian ini adalah enam di antara kombinasi yang menghasilkan profil DNA yang jelas terbaca pada analisis AFLP di kelapa sawit (Ningrum *et al.*, 2014). Hal tersebut merupakan tata cara agar hasil optimasi protokol BSA-AFLP untuk penyaringan kandidat marka segera dapat diperoleh.

Protokol BSA-AFLP menghasilkan profil AFLP yang jelas, mudah dibaca dan *reproducible* (Gambar 1). Hasil menunjukkan bahwa penggabungan DNA yang sama (dengan individu yang sama) yang digunakan sebagai cetakan amplifikasi menghasilkan profil DNA yang serupa setelah digunakan pada protokol AFLP yang sama. Penggabungan DNA dari 5

hingga 15 individu dapat digunakan sebagai cetakan proses amplifikasi dalam analisis BSA-AFLP, karena menghasilkan profil DNA yang jelas dan mudah dibaca.

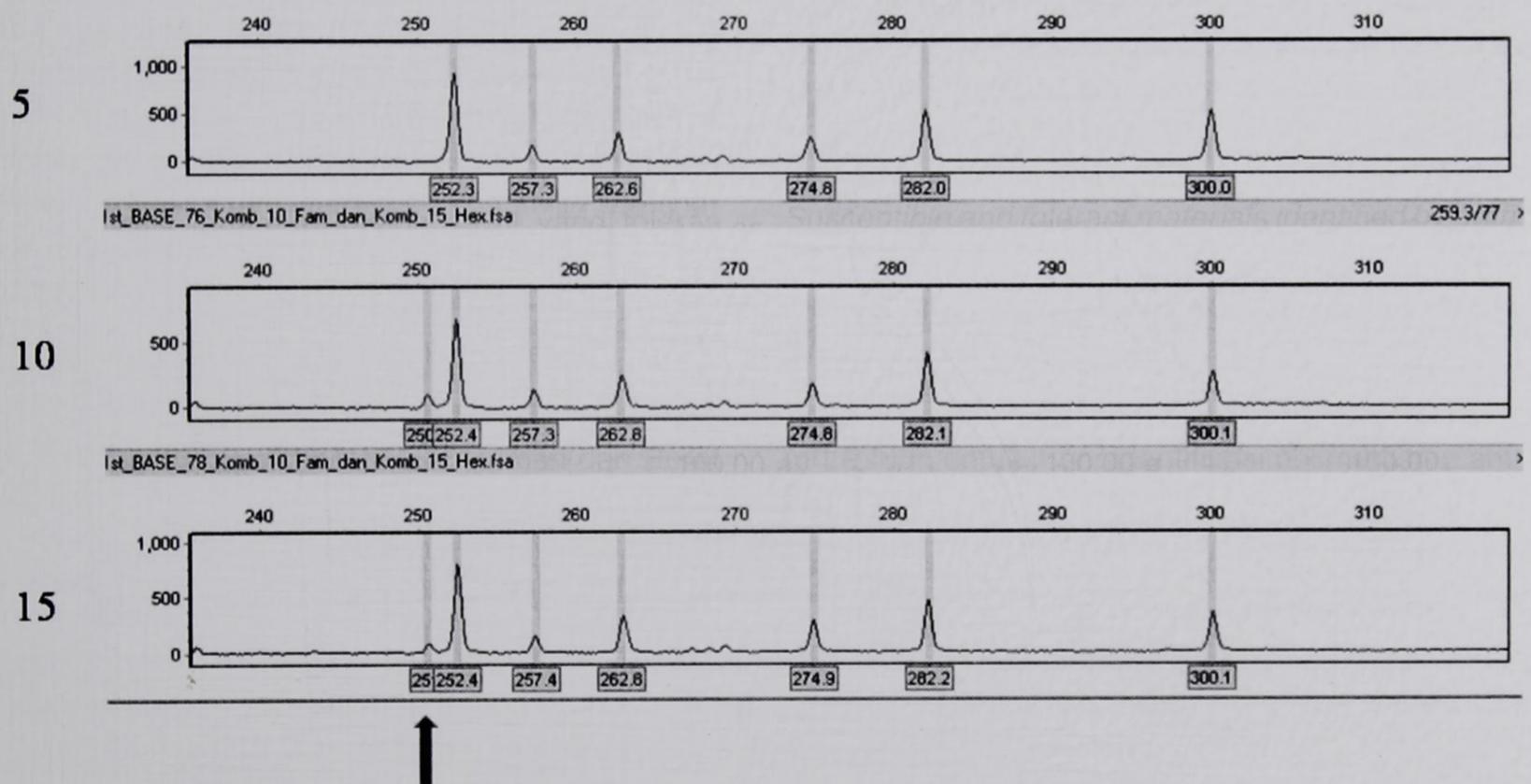


Gambar 1. Profil BSA-AFLP menggunakan DNA gabungan dari 5 individu (5), 10 individu (10) dan 15 individu (15) dari satu projeni menggunakan kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/MseI-CAG

Figure 1. BSA-AFLP profiles of DNA bulking of 5 individuals (5), 10 individuals (10) and 15 individuals (15) of progeny 1091 by using selective primer combination EcoRI-AGG/MseI-CAG

Hasil tersebut menunjukkan bahwa strategi pemilihan teknik AFLP sudah tepat. Teknik AFLP terbukti bersifat *reproducible* (Vignal *et al.*, 2002), sehingga sesuai jika digunakan untuk keperluan penyaringan. Walaupun teknik tersebut memiliki beberapa tahap yang agak kompleks jika dibandingkan teknik PCR yang lain, tetapi dengan memanfaatkan teknik BSA dan multipleks PCR (penggabungan hasil amplifikasi yang berlabel fluoresen berbeda sebagai satu contoh analisis fragmen), volume pekerjaan berupa jumlah contoh yang dianalisis dapat ditekan. Hal tersebut sesuai dengan uraian Paun *et al.*, (2012).

Walaupun demikian, dijumpai beberapa perbedaan profil AFLP pada gabungan jumlah contoh yang berbeda (Gambar 2). Pada gambar tersebut dapat diamati adanya fragmen AFLP dengan ukuran 200 bp, yang tidak terdapat pada gabungan DNA sampel 1 hingga 5, tetapi terdapat pada gabungan DNA sampel nomor 1 hingga 10 dan 1 hingga 15. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat individu pada contoh 6 hingga 15 yang memiliki fragmen 200 bp tersebut tetapi tidak terdapat pada individu pada sampel nomor 1 hingga 5.



Gambar 2. Profil BSA-AFLP bibit sehat pada gabungan DNA individu nomor 1 hingga 5 (5), nomor 1 hingga 10 (10) dan nomor 1 hingga 15 (15) pada progeni 1091 menggunakan kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/MseI-CAG. Tanda panah menunjukkan polimorfisme fragmen AFLP berukuran 200 bp di antara perlakuan penggabungan jumlah contoh yang berbeda

Figure 2. BSA-AFLP profiles of healthy seedling DNA bulking of individual 1 up to 5 (5), 1 up to 10 (10) and 1 up to 15 (15) of progeny 1091 by using selective primer combination EcoRI-AGG/MseI-CAG. Arrow shows the AFLP polymorphic fragment (200 bp size) among the different bulking treatments

Hal tersebut menunjukkan bahwa polimorfisme semu mungkin dapat diperoleh jika jumlah individual yang DNA-nya digabung terlalu sedikit. Semakin tinggi jumlah individual yang DNA-nya digabungkan, akan semakin baik untuk tujuan analisis menggunakan BSA-AFLP, karena data polimorfisme sifat yang diamati akan semakin sahih, mewakili polimorfisme sifat yang dimaksud. Tetapi, semakin tinggi jumlah individual yang DNA-nya digabungkan, beresiko menghasilkan profil DNA yang tidak jelas, sehingga perlu dilakukan optimasi antara jumlah individu yang DNA-nya digabungkan dengan hasil profil AFLP yang diperoleh. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggabungan DNA hingga 15 individu masih menghasilkan profil AFLP yang jelas. Jumlah individu tersebut mungkin masih dapat ditingkatkan sepanjang profil AFLP yang jelas masih dapat diperoleh. Pada penelitian sebelumnya, BSA dapat dilakukan dengan penggabungan 14 hingga 20 tanaman (Michelmore *et al.*, 1991).

Penyaringan marka AFLP

Hasil penyaringan marka AFLP menggunakan protokol BSA-AFLP menunjukkan bahwa dari enam kombinasi primer selektif, diperoleh total 190 lokus, dengan rata-rata jumlah lokus per kombinasi primer selektif sebesar $31,67 \pm 9,91$ (Tabel 1). Kombinasi primer selektif EcoRI-AGG/Msel-CAC menghasilkan 25 lokus (jumlah lokus paling sedikit) dan kombinasi primer selektif EcoRI-ACA/Msel-CTT menghasilkan 51 lokus (jumlah lokus paling banyak). Rata-rata jumlah lokus yang diperoleh tersebut lebih banyak daripada yang diperoleh dalam penggunaan AFLP pada kajian yang dilakukan oleh Ningrum *et al.*, (2014), tetapi lebih sedikit daripada kajian yang dilakukan oleh Purba *et al.*, (2000). Perbedaan tersebut diperoleh karena perbedaan kombinasi primer yang digunakan dan perbedaan individu yang dianalisis. Hasil menunjukkan tingginya jumlah lokus yang diperoleh per primer yang digunakan dalam sekali reaksi PCR, yang merupakan kelebihan yang dimiliki oleh teknik AFLP dibandingkan teknik PCR yang lain (Vignal *et al.*, 2002).

Tabel 1. Jumlah lokus dan jumlah lokus polimorfik yang dihasilkan oleh tiap kombinasi primer selektif yang digunakan dalam BSA-AFLP

Table 1. Number of loci and polymorphic loci resulted from each selective primer combination in BSA-AFLP

Kombinasi primer selektif	Jumlah L	Jumlah P
EcoRI-AGG/Msel-CAC	25	0
EcoRI-ACA/Msel-CAG	33	0
EcoRI-ACA/Msel-CTT	51	1
EcoRI-AGG/Msel-CAG	26	0
EcoRI-AGA/Msel-CTT	26	0
EcoRI-AGA/Msel-CAC	29	0
Total	190	
Rerata	31,67	

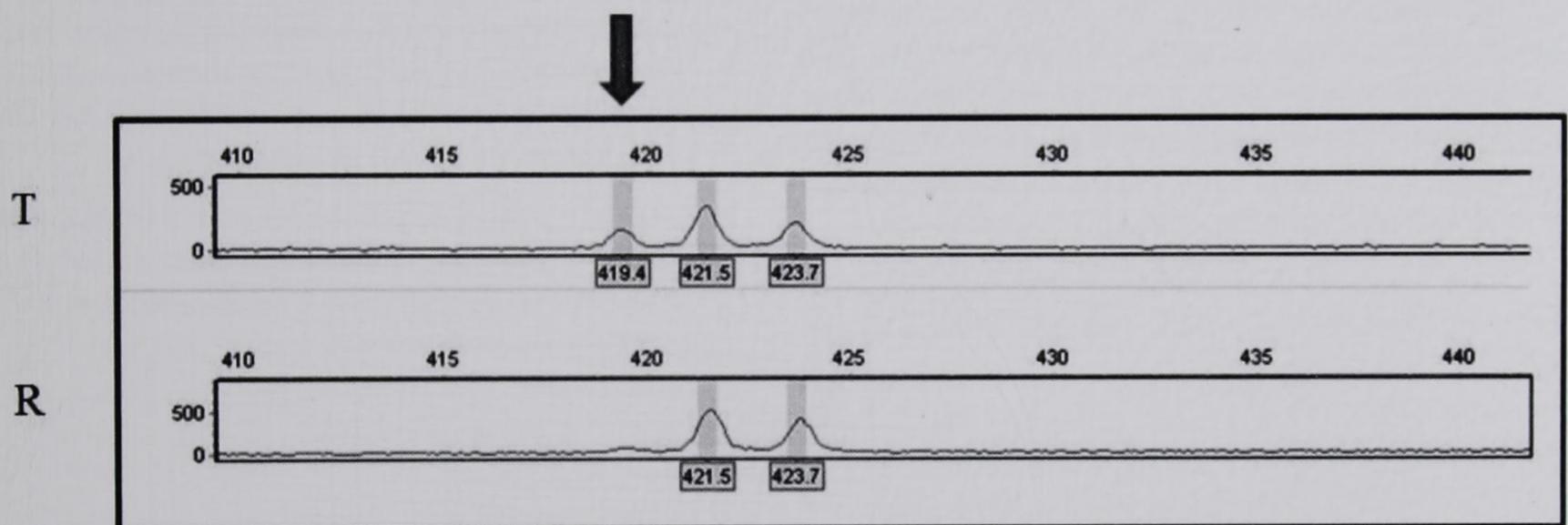
Keterangan: L: Lokus yang dihasilkan; P: Lokus yang polimorfik di antara gabungan sampel sehat dan sakit

Dari 190 lokus AFLP yang diperoleh, hanya satu lokus yang diperoleh dari penggunaan kombinasi primer selektif EcoRI-ACA/MseI-CTT, yang menunjukkan polimorfisme di antara gabungan individu toleran dan rentan. Untuk menghindari kesalahan identifikasi dan untuk membatasi jumlah verifikasi yang perlu dilakukan untuk setiap kandidat marka teridentifikasi, hanya marka yang menunjukkan grafik polimorfisme yang jelas saja yang dianggap sebagai marka polimorfik. Rendahnya tingkat perolehan kandidat marka per total jumlah lokus yang diperoleh ($1/190=0,5\%$) menunjukkan bahwa keenam primer kombinasi yang digunakan kurang mengenai target daerah genom yang berhubungan dengan toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*. Sebagai

perbandingan, pada satu kajian BSA-AFLP untuk mengidentifikasi warna kulit buah kelapa sawit yang dilakukan oleh Ying (2005), diidentifikasi 3 marka yang diharapkan dari penggunaan 10 kombinasi primer.

Kandidat marka DNA untuk identifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*

Dari hasil amplifikasi menggunakan 6 kombinasi primer selektif, diidentifikasi satu marka yang polimorfik antara gabungan DNA individu rentan dan toleran. Marka tersebut berukuran 419 *base pairs* (bp) yang terdapat pada gabungan DNA individu toleran tetapi tidak terdapat pada gabungan DNA sampel rentan (Gambar 3).



Gambar 3. Profil BSA-AFLP menggunakan penggabungan DNA individu toleran (T) dan rentan (R), masing-masing merupakan penggabungan dari 15 individu dari populasi 1091 menggunakan kombinasi primer selektif EcoRI-ACA/MseI-CTT. Tanda panah menunjukkan marka yang polimorfik, berukuran 419 bp.

Figure 3. BSA-AFLP profiles using DNA bulking of tolerant (T) and susceptible (R) samples, by using 15 individuals of progeny 1091 respectively, with selective combination primer EcoRI-ACA/MseI-CTT. Arrow shows a polymorphic marker, 419 bp size.

Pembahasan Umum

Pendekatan melalui BSA-AFLP dilakukan sebagai salah satu pendekatan untuk identifikasi marka toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*, selain pendekatan yang lain seperti pemetaan genetik (Zhou *et al.*, 2003) dan pengurutan DNA (Wening *et al.*, 2013). Pada BSA, pendekatan dilakukan dengan asumsi tidak diketahuinya informasi genetik pada sifat yang akan diidentifikasi, sehingga pencarian marka DNA dilakukan secara acak melalui penyaringan.

Karena pencarian dilakukan secara acak, maka diperlukan penyaringan yang ekstensif. Teknik AFLP dianggap tepat untuk pendekatan ini karena mampu menghasilkan jumlah lokus yang tinggi setiap reaksi PCR per kombinasi primer selektif. Karena daerah genom yang terlibat dalam ekspresi suatu sifat terdapat pada genom tertentu, maka penggunaan primer dengan situs restriksi dan kombinasi yang berbeda perlu dilakukan, sehingga analisis dapat dilakukan pada berbagai daerah pada genom (Mank *et al.*, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Mohamad Ali

dan Abdul Manaf (2011) menunjukkan bahwa terdapat beberapa gen yang terlibat dalam proses patogenisitas *Ganoderma* terhadap kelapa sawit. Hal tersebut menunjukkan bahwa perlu diidentifikasi lebih dari satu kandidat marka DNA. Karena pada kajian ini baru ditemukan satu kandidat marka, maka penyaringan terhadap marka DNA tersebut perlu dilanjutkan

Selain penyaringan yang ekstensif, diperlukan populasi yang tepat untuk melakukan penyaringan. Pada kajian ini, penyaringan dilakukan pada satu populasi keturunan yang bersegregasi pada sifat toleransinya terhadap *Ganoderma* dan merupakan hasil persilangan dura dan pisifera, yang masing-masing telah mengalami silang dalam pada beberapa generasi sehingga diharapkan tingkat homogenitas keturunan hasil persilangan tersebut tinggi. Dan karena merupakan satu populasi keturunan, maka terdapat tingkat kesamaan genetik yang tinggi. Hal tersebut mengakibatkan penyaringan perbedaan tingkat toleransi terhadap *Ganoderma* yang efisien.

Hasil yang telah diuraikan di atas menunjukkan bahwa penggabungan DNA menggunakan protokol AFLP hasil optimasi dapat digunakan untuk memproduksi profil DNA yang jelas dan *reproducible*, dalam usaha penyaringan kandidat marka DNA pengidentifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*. Perlu dilakukan verifikasi terhadap kandidat marka telah teridentifikasi, dengan menggunakan jumlah contoh yang lebih banyak. Kandidat marka yang sudah diidentifikasi mungkin hanya polimorfik pada contoh yang digunakan pada penyaringan, tetapi ketika jumlah contoh ditambah, tidak terdapat polimorfisme. Hal tersebut merupakan indikasi bahwa marka tersebut bukan merupakan marka yang terkait dengan toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*.

Penggunaan populasi keturunan yang berbeda perlu juga dilakukan, karena terdapat interaksi antara populasi (dasar genetik kelapa sawit) dengan toleransinya terhadap serangan *Ganoderma* (Setiawati *et al.*, 2014). Kemungkinan, terdapat keragaman lokus yang bertanggung jawab terhadap sifat toleransi tersebut pada populasi kelapa sawit yang berbeda. Marka yang teridentifikasi di suatu populasi mungkin tidak terdapat pada populasi lain, ataupun sebaliknya. Informasi tersebut sangat

berguna untuk memahami patogenisitas kelapa sawit pada populasi yang berbeda.

Kandidat marka AFLP yang telah diverifikasi dapat digunakan untuk identifikasi kelapa sawit yang toleran terhadap *Ganoderma*. Walaupun teknik AFLP sesuai digunakan pada tahap penyaringan marka DNA, tetapi untuk keperluan uji rutin dalam skala yang besar dipandang kurang efisien, sehingga perlu dikonversi menjadi teknik berbasis PCR yang lain, seperti STS (*Sequence Tagged Site*) atau CAP (*Cleaved Amplified Polymorphism*) (Ying, 2005).

KESIMPULAN

1. Protokol BSA-AFLP menggunakan penggabungan DNA hingga 15 individu dapat digunakan sebagai protokol dalam penyaringan kandidat marka DNA pengidentifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*.
2. Telah teridentifikasi satu kandidat marka DNA untuk identifikasi toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma* setelah penyaringan menggunakan 6 kombinasi primer selektif.

SARAN

1. Perlu dilakukan verifikasi terhadap kandidat marka DNA yang telah diidentifikasi dengan menggunakan jumlah sampel dan populasi yang lebih banyak.
2. Skrining polimorfisme dapat diteruskan menggunakan kombinasi primer AFLP yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, K.S., Jackson, P.A. dan McIntyre, C.L. (2005) A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 110:789-801.
- Becker, A., Chao, D.-Y., Zhang, X., Salt, D.E. dan Baxter, I. (2011) Bulk Segregant Analysis using Single Nucleotide Polymorphism Microarrays. *PLoS One* 6: e15993.

- Benor, S., Demissew, S., Hammer, K. dan Blattner, F.R. (2012) Genetic diversity and relationships in *Corchorus olitorius* (Malvaceae s.l.) inferred from molecular and morphological data. *Genetic Resource and Crop Evolution* 59:1125-1146.
- Cai, Q., Aitken, K.S., Fan, Y.H., Piperidis, G., Liu, X.L., McIntyre, C.L., Huang, X.Q. dan Jackson, P. (2012) Assessment of the genetic diversity in a collection of *Erianthus arundinaceus*. *Genetic Resource and Crop Evolution* 59:1483-1491.
- Cheema, K.K., Grewal, N.K., Vikal, Y., Sharma, R., Lore, J.S., Das, A., Bhatia, D., Mahajan, R., Gupta, V. dan Bharaj, T.S. (2008) A novel bacterial blight resistance gene from *Oryza nivara* mapped to 38 kb region on chromosome 4 L and transferred to *Oryza sativa* L. *Genetical Research* 90:397.
- Mank, M.V.R., Antonise, R., Bastiaans, E., Senior, M.L., Stuber, C.W., Melchinger, A.E., Lübberstedt, T., Xia, X.C., Stam, P., Zabeau, M. dan Kuiper, M. (1999) Two high-density AFLP® linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. 99:921-935.
- Michelmore, R.W., Paran, I. dan Kessel, R.V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:9828-9832.
- Mohamad Ali, F. dan Abdul Manaf, M.A. (2011). Differentially expressed genes in susceptible oil palm (*Elaeis guineensis*) progeny artificially infected with *Ganoderma boninense*. PIPOC, Kuala Lumpur. MPOB
- Morcillo, F., Cros, D., Billotte, N., Ngando-Ebongue, G.-F., Domonhédou, H., Pizot, M., Cuéllar, T., Espéout, S., Dhouib, R., Bourgis, F., Claverol, S., Tranbarger, T.J., Nouy, B. dan Arondel, V. (2013) Improving palm oil quality through identification and mapping of the lipase gene causing oil deterioration. *Nature Communications* 4:2160.
- Ningrum, D.A., Wening, S. dan Hanum, S. (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
- Paun, O. dan Schönswetter, P. (2012) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies. *Methods in Molecular Biology* 862:75-87.
- Purba, A.R., Noyer, J.L., Baudouin, L., Perrier, X., Hamon, S. dan Lagoda, P.J.L. (2000) A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isozyme and AFLP markers and its consequences for breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 101:956-961.
- Qiagen (2006) DNeasy® Plant Hand Book. Qiagen.
- Sardaro, M.L., Atallah, M., Picarella, M.E., Aracri, B. dan Pagnotta, M.A. (2012) Genetic diversity, population structure and phylogenetic inference among Italian Orchids of the *Serapias* genus assessed by AFLP molecular markers. *Plant Systematic Evolution* 298:1701-1710.
- Setiawati, U., Rahmaningsih, M., Breton, F., Sore, R., Nelson, S. dan Caligari, P.D.S. (2010). Screening of Sumatra Bioscience progenies for *Ganoderma* partial resistance in field and nursery trials. International Oil Palm Conference, Yogyakarta. IOPRI
- Setiawati, U., Rahmaningsih, M., Ritonga, H., Nelson, S. dan Caligari, P.D.S. (2014). Advances in breeding for *Ganoderma* partial resistance in field and nursery trials. IOPC, Indonesian Oil Palm Research Institute.
- Susanto, A. (2009). Basal stem rot in Indonesia: Biology, economic importance, epidemiology, detection and control. International Workshop of Awareness, Detection and Control of Oil



- Palm Devastating Diseases, Kuala Lumpur.
- Susanto, A., Prasetyo, A.E. dan Wening, S. (2013) Laju Infeksi *Ganoderma* pada Empat Kelas Tekstur Tanah. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 9:39-46.
- Susanto, A., Rahmadi, H.Y., Priwiratama, H., Yenni, Y., Suprianto, E. dan Purba, A.R. (2011) Seleksi ketahanan berbagai persilangan kelapa sawit terhadap *Ganoderma boninense*. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 19:43-53.
- Vignal, A., Denis, M., Sancristobal, M. dan Eggen, A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34:275-305.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. dan Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wang, R., Sun, L., Bao, L., Zhang, J., Jiang, Y., Yao, J., Song, L., Feng, J., Liu, S. dan Liu, Z. (2013) Bulk segregant RNA-seq reveals expression and positional candidate genes and allele-specific expression for disease resistance against enteric septicemia of catfish. *BMC Genomics* 14:929.
- Wening, S., Prasetyo, A.E., Susanto, A., Rahmadi, H.Y., Yenni, Y. dan Purba, A.R. (2013). Keragaman sekuen gen kitinase: Identifikasi penanda toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*. *Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013*, Jakarta. PPKS
- Wening, S., Wilkinson, M.J., Djuhjana, J., Nelson, S.P.C., Okyere-Boateng, G., Forster, B.P., Croxford, A.E. dan Caligari, P.D.S. (2009). Genetic relationship studies of Sumatra Bioscience oil palm germplasm using ISSR and AFLP profiles. *PIPOC*, Kuala Lumpur. MPOB
- Wening, S. dan Yenni, Y. (2013). Optimasi Analisa Sidik Jari DNA Kelapa Sawit. *Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013*, Jakarta. Pusat Penelitian Kelapa Sawit
- Ying, S.T. 2005. Identification of Amplified Fragment Length Polymorphism fragments linked to fruit skin colour of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Universiti Putra Malaysia*.
- Zhou, W.-C., Kolb, F.L., Bai, G.-H., Domier, L.L., Boze, L.K. dan Smith, N.J. (2003) Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding* 122:40-46.