

PENGEMBANGAN PENANDA MOLEKULER BERDASARKAN SITUS SNP DAN INDEL GENOM KLOROPLAS KELAPA

Development of Molecular Marker Based on SNP sites and Indel in Coconut Chloroplast Genome

Freta Kirana Ballardona^{1*}, Ismail Maskromo², Dewi Sukma¹, Sudarsono¹

¹Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jln. Meranti-Kampus Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

²Balai Penelitian Tanaman Palma

Jalan Raya Mapanget, Kotak Pos 1004, Manado 95001

*Email: fretaballadona@gmail.com

Diterima 1 Juni 2019/Disetujui 12 Maret 2020

ABSTRAK

Saat ini informasi dasar mengenai silsilah, keragaman dan hubungan evolusi kekerabatan menggunakan marka molekuler pada kelapa di Indonesia masih kurang. Hal ini dibuktikan dengan belum banyak dilaporkan urutan sekuens genom kelapa Indonesia yang dapat dijadikan dasar dalam pembuatan marka molekuler tersebut. Salah satu genom tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai penanda adalah sekuens genom kloroplas (cpDNA). Genom kloroplas merupakan penanda yang efisien untuk mempelajari evolusi dan sejarah populasi tanaman melalui filogenetik karena bersifat sangat konservatif, diwariskan secara maternal, memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan genom inti. Tujuan dari penelitian ini adalah pengembangan primer berdasarkan genom kloroplas berbasis situ SNP dan indels. Berdasarkan sembilan sekuens genom kloroplas pada tanaman palma, telah berhasil didisain 10 primer berdasarkan situs SNP dan 5 primer berdasarkan situs insersi delesi. Hasil validasi primer tersebut menggunakan DNA kelapa Indonesia didapatkan hasil bahwa 10 primer SNP berhasil teramplifikasi sedangkan indels hanya 2 primer berbasis PCR.

Kata kunci: dalam, genjah, SNAP, primer

ABSTRACT

Nowadays, the basic information about family tree diversity and the relationship of evolution of kinship using molecular markers on coconut in Indonesia is still lacking. This is proofed by the fact that there is not many reported sequences of Indonesian coconut genomes, which can be used as a basic for making molecular markers. One of the plant genomes that can be used as a marker is the chloroplast (cpDNA) genome sequence. The chloroplast genome is an efficient marker for studying the evolution and history of plant populations through phylogenetics because it is very conservative, inherited maternally, has a smaller size compared to the core genome. The purpose of the study is development of molecular marker based on SNP sites and Indel in coconut chloroplast genome. Based on the nine chloroplasts genome sequences in palm plants, 10 primers were successfully designed based on SNP sites and 5 primers based on deletion insertion sites. The results of the primary validation using Indonesian coconut DNA showed that 10 SNP primers were successfully amplified while indels were only 2 primers PCR based.

Keywords: tall, dwarf, SNAP, primer

PENDAHULUAN

Keberadaan kelapa yang memiliki nilai sejarah yang tidak lepas dari perkembangan peradaban masyarakat di daerah tropis. Baik secara historis maupun saat ini, kelapa memiliki banyak kegunaan yaitu sebagai sumber makanan, minuman dan bahan bakar. Bahkan semua bagian tanaman tersebut dapat dimanfaatkan (Gunn 2016).

Produksi kelapa dari tahun ke tahun mengalami penurunan karena berbagai alasan namun masih bernilai ekonomi yang penting dengan adanya permintaan industri yang tinggi (Larekeng 2015). Penurunan tersebut akibat dari rendahnya produktivitas dengan rata-rata 1 t kopra/ha/tahun padahal potensi produksi kelapa dapat mencapai 3-5 t kopra/ha/tahun (Pesik 2016). Banyak faktor yang mempengaruhi hal tersebut, diantaranya adalah faktor lingkungan yaitu kekeringan, bencana alam, hama dan penyakit serta persaingan dari minyak nabati dari komoditas lainnya menyebabkan kelapa ditinggalkan. Faktor lainnya adalah pohon kelapa yang telah ditanam sejak lama dan belum dilakukan peremajaan dan rehabilitasi, erosi genetik serta ketersediaan varietas kelapa unggul yang memiliki produktivitas yang tinggi dan mampu beradaptasi dengan baik (Batugal *et al.* 2005). Oleh karena itu, salah satu cara untuk mengatasi berbagai permasalahan tersebut adalah dengan menggunakan varietas unggul.

Perakitan varietas unggul dapat dilakukan dengan program pemuliaan tanaman. Salah satu contohnya adalah kelapa hibrida yang memiliki karakter pohon yang pendek, cepat berbuah dan memiliki kadar minyak yang tinggi (Novarianto 2010). Metode pemuliaan tanaman yang dilakukan adalah seleksi dan hibridisasi untuk merakit berbagai jenis kelapa hibrida, terutama kelapa hibrida hasil persilangan antar kelapa Genjah x kelapa Dalam (Novarianto 2008). Kegiatan pemuliaan seperti seleksi, hibridisasi dan penyebaran tanaman yang terus menerus

(Loiola *et al.* 2016) serta kondisi geologi dan iklim yang bervariasi akan mengakibatkan terbentuknya aliran gen di dalam populasi, kerusakan genetik dan juga terbentuknya keterkaitan adanya hubungan antar tanaman (Jia *et al.* 2016). Hal ini juga akan mempengaruhi pada proses evolusi biologi yang dialami oleh tanaman tersebut. Untuk mempelajari kontrol pewarisan suatu karakter pada tanaman, maka diperlukan silsilah yang lengkap dan jelas asal usul persilangan pada setiap generasi (Pesik 2016).

Saat ini informasi dasar mengenai silsilah, keragaman dan hubungan evolusi kekerabatan menggunakan marka molekuler pada kelapa di Indonesia masih kurang. Hal ini dibuktikan dengan belum banyak dilaporkan urutan sekuens genom kelapa Indonesia yang dapat dijadikan dasar dalam pembuatan marka molekuler tersebut. Salah satu genom tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai penanda adalah sekuens genom kloroplas (cpDNA). Genom kloroplas merupakan penanda yang efisien untuk mempelajari evolusi dan sejarah populasi tanaman melalui filogenetik karena bersifat sangat konservatif, diwariskan secara maternal, memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan genom inti (Dauby *et al.* 2010).

Genom kloroplas dapat dimanfaatkan dalam pembentukan marka molekuler SNAP (*Single Nucleotide Amplified Polymorphism*). Marka SNAP adalah marka berdasarkan variasi perubahan satu basa (A, T, G, C) pada situs-situs tertentu dari runutan basa DNA dalam genom organisme (Ganal *et al.* 2009). Polimorfisme SNP tersedia melimpah dan terdistribusi secara merata pada genom organisme hidup sehingga mudah dimanfaatkan dalam analisis untuk mengidentifikasi keragaman yang tinggi (Peterson *et al.* 2014). Marka DNA berbasis SNAP adalah satu-satunya marka DNA yang memiliki sifat bi-alel dan ko-dominan, sehingga mampu membedakan alel homozigot dari heterozigot yang efisien (Hu *et al.* 2015). Marka SNAP juga terbukti

menghasilkan kualitas data yang lebih baik dari sejumlah besar sampel pada penelitian genetika dan evolusi (Ren *et al.* 2013).

Saat ini telah dikembangkan oleh Pesik (2016) marka SNAP berbasis gen WRKY, SUS, SACPD dan ABI3 dalam riset pada populasi kelapa Indonesia yang diperoleh dari bank data yang sudah tersedia. Namun, pengembangan penanda genom kloroplas (cpDNA) berbasis SNAP belum ada, begitu pula dengan berbasis insersi delesi atau Indels. Indels merupakan penanda genetik berbasis urutan lainnya seperti SSR dan SNPs dan dikenal sebagai sistem penanda yang efektif untuk analisis genetika pada tanaman terutama yang bersifat multi-allelic dan co-dominant dan distribusi genetika yang luas. Selain itu, penanda InDel mudah terdeteksi pada skala genom (tingkat gen) dengan biaya rendah, tenaga kerja dan waktu melalui perbandingan sumber genomik (transkriptom) yang dapat diakses secara bebas dari genotipe yang tersedia melalui alat genetika komputasi (Das *et al.* 2015). Berdasarkan alasan-alasan tersebut indels dapat dijadikan alternatif sebagai penanda molekuler yang lebih efektif.

Maka dari itu identifikasi kekerabatan serta hubungan evolusi kelapa di Indonesia menggunakan marka molekuler khususnya genom kloroplas (cpDNA) berbasis SNAP merupakan alat bantu yang strategis yang dapat mempersingkat waktu seleksi, sehingga dapat mempercepat pencapaian tujuan pemuliaan tanaman, untuk menyediakan sumberdaya genetik yang memiliki karakter unggul dalam waktu yang singkat. Jadi tujuan dari penelitian ini adalah pengembangan primer berdasarkan genom kloroplas berbasis situ SNP dan indels.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Mei-September 2017 (*In silico*) hingga Juli 2018 di Laboratorium Plant Molecular Biology (PMB) I Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Desain primer genom kloroplas dilakukan dengan mengakses data sekuens cpDNA tanaman palma pada bank data (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dan sekuens genom kloroplas kelapa Indonesia yang telah dikembangkan (*personal communication*) yang digunakan untuk mendesain primer SNAP. Setiap sekuens dalam kelompok gen disusun dalam file teks menurut format Fasta. Sekuens disejajarkan menggunakan *multiple alignment* untuk mengidentifikasi letak satu basa nukleotida yang berbeda menggunakan program Geneious Pro 5.6.6 versi percobaan (Biomatters, USA).

Hasil *multiple alignment* cpDNA disubmit secara *online* menggunakan program WebSNAPER pada situs <http://ausubellab.mgh.harvard.edu>. Setiap submit hanya mendefinisikan satu titik SNP, sehingga untuk titik SNP lain maka submit dilakukan berulang. Masing-masing hasil desain untuk setiap situs SNP dipilih dua set (empat primer) yang terdiri atas satu set (sepasang primer) untuk alel referensi (R) dan satu set untuk alel alternatif (A). Setelah diperoleh runutan primer dilanjutkan dengan pemilihan primer sesuai dengan jumlah situs SNP.

Desain primer genom kloroplas dilakukan dengan mengakses data sekuens cpDNA tanaman palma pada bank data, sekuens genom kloroplas kelapa Indonesia yang telah dikembangkan yang berasal dari Indonesia yang digunakan untuk mendesain primer SNAP. Setiap sekuens dalam kelompok gen disusun dalam file teks menurut format Fasta. Sekuens disejajarkan menggunakan *multiple alignment* untuk mengidentifikasi letak satu basa nukleotida yang berbeda menggunakan program GENEIOUS. Hasil *multiple alignment* cpDNA yaitu keberadaan inserdi-delesi pada genom kloroplas tersebut, disubmit secara *online* menggunakan program Primer3plus pada situs <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Primer SNAP dan Indels diuji kemampuannya untuk menghasilkan

produk amplifikasi menggunakan DNA yang telah diisolasi sebelumnya yaitu 1 genotipe kelapa Morotai dan 1 genotipe kelapa unggul Indonesia dengan reaksi singleplex PCR. Suhu annealing primer SNAP dioptimasi menggunakan gradien thermocycling PCR untuk meningkatkan efisiensi PCR. Kombinasi suhu yang digunakan adalah 48.0°C, 49.5°C, 52.8°C, 54.6°C, 56.4°C, 58.2°C dan 60.0°C. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan KAPA2G™ PCR kit (*Kapa Biosystems Inc., USA*). Komposisi reaksi singleplex terdiri atas 6.25 µL PCR mix, 0.3 µL masing-masing primer (reference-reverse, alternate-reverse, forward-reverse), 4 µL DNA dan ultra purewater (ddH₂O) steril ditambahkan sehingga volume akhir menjadi 13 µL. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR BioRad T100™ *Thermal Cycler*. Amplifikasi DNA diawali dengan satu siklus tahap pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus yang terdiri atas: tahapan denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, penempelan primer pada suhu 48°C–60°C selama 15 detik (sesuai suhu *annealing* primer), pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 1 detik. Pada tahap akhir proses PCR dilakukan pemanjangan akhir pada 72°C selama 10 menit. Produk PCR dipisahkan berdasarkan ukuran menggunakan gel agarosa 2% (*Vivantis Inc., USA*) dalam 1x SB buffer pada arus konstan sebesar 50 volt selama 30 menit. Ukuran produk amplifikasi diestimasi dengan perbandingan DNA ladder 100 pb (*Vivantis Inc., USA*). Pita DNA divisualisasi menggunakan pewarnaan 33% (v/v) GelreD™ (*Biotium Inc.*) di bawah lampu UV (*Vilber Lourmat Super Bright TFX-20 MX, Sigma-Aldrich*) dan didokumentasikan dengan kamera digital.

Validasi produk hasil amplifikasi PCR untuk lokus Indels dilakukan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 6% menggunakan buffer SB 1x (*Brody dan Kern 2004*) dan pewarnaan gel dengan perak nitrat. Tahapan pewarnaan gel dengan perak nitrat

dilakukan mengikuti metode *Creste et al.* (2001) yang dimodifikasi (*Tinche et al.* 2014). Visualisasi menggunakan UV transluminesen dan elektroforegram di foto menggunakan kamera digital. Penentuan genotipe setiap individu yang dievaluasi dilakukan berdasarkan skoring keragaman alel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain primer untuk menghasilkan marka SNAP dan indels pada situs-situs genom kloroplas yang teridentifikasi

Ketersediaan sekuen genom kloroplas kelapa, kurma dan kelapa sawit

Sekuen cpDNA tanaman palma yaitu kelapa, kurma dan kelapa sawit didapatkan melalui tiga cara yaitu dengan penelusuran melalui jurnal yang telah dipublikasikan, melalui situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dan melalui *personal communication* dengan Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc. Pada penelusuran melalui situs tersebut disusun dalam format fasta agar dapat disejajarkan dalam *multiple sequence alignment* seperti yang tercantum pada Tabe 1. Beberapa sekuen tanaman palma yang digunakan yaitu pada kelapa, kurma dan kelapa sawit untuk melihat beberapa variasi SNP dan Indel antara tanaman kelapa dengan tanaman kelapa (*Intraspecies*) dan tanaman kelapa dan tanaman palma lainnya (*Interspecies*).

Multiple Sequence Alignment dan Identifikasi SNP dan Indels

Sekuens genom tanaman palma disusun dalam file teks menurut format fasta. Kemudian sekuens tersebut disejajarkan menggunakan *multiple alignment* oleh program *Geneious Pro 5.6.6* versi percobaan (*Biomatters, USA*). *Multiple alignment* tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi persebaran SNP dan Indel di dalam sekuen. Identifikasi keberadaan SNP pada Gambar 2 dengan cara memilih sekuen yang memiliki dua jenis basa nukleotida yang berbeda yang memiliki

karakter bi-alelik, yang mana menggambarkan dua kromosom homolog dari individu diploid. Pada penentuan indels, maka yang dilihat adalah adanya

variasi insersi dan delesi yaitu ditemukan adanya bagian basa yang hilang dan yang terisi (Gambar 3).

Tabel 1 Daftar Sekuens (Asal) Genom Kelapa, Kurma dan Kelapa Sawit

No	ID Akses	Ukuran Sekuens	Spesies Tanaman	Sumber
1.	CT Cn	158.462	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Personal communication</i>
2.	KF285453.1 Cn	154.731	<i>Cocos nucifera</i>	Huang <i>et al.</i> 2013
3.	KX028884.1 Cn	154.740	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Personal communication</i>
4.	NC_022417.1 Cn	154.731	<i>Cocos nucifera</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
5.	FJ212316.3 DP	158.458	<i>Phoenix dactylifera</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
6.	GU811709.2 DP	158.462	<i>Phoenix dactylifera</i>	Yang <i>et al.</i> 2010
7.	NC_013991.2 DP	158.462	<i>Phoenix dactylifera</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
8.	JF274081.1 OP	156.973	<i>Elaeis guineensis</i>	Uthaipasanwong <i>et al.</i> 2012
9.	NC_017602.1 OP	156.973	<i>Elaeis guineensis</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Pada pola variasi baik SNP maupun Indels, ditemukan adanya tiga pola pada sebagian besar sekuens. Pola yang pertama menunjukkan adanya kesamaan variasi antara genom CT Cn dengan FJ212316.3 DP, GU811709.2 DP dan NC_013991.2 DP. Kemudian, pola yang kedua ditemukan adanya kesamaan variasi SNP antara genom CT Cn dengan semua genom

kecuali JF274081.1 OP dan NC_017602.1 OP. Selanjutnya pola ketiga adalah genom CT Cn sama dengan semua kecuali KF285453.1 Cn, KX028884.1 Cn dan NC_022417.1 Cn. Hal ini dapat dipakai sebagai pertimbangan dalam pemilihan primer yang akan digunakan dalam penelitian selanjutnya.



Gambar 2 Penampilan *Multiple Sequence Alignment* genom tanaman palma yang menunjukkan adanya SNP dengan representatif tiga variasi pola SNP yang berbeda.

Desain Primer SNAP berdasarkan SNP

Pada dasarnya, SNAP merupakan marka berdasarkan variasi perubahan satu basa (A, T, G, C) pada situs-situs tertentu dari runutan basa DNA dalam genom organisme (Ganal *et al.* 2009). Polimorfisme SNP tersedia melimpah dan terdistribusi secara merata pada genom organisme hidup sehingga mudah dimanfaatkan dalam analisis untuk mengidentifikasi keragaman yang tinggi

(Peterson *et al.* 2014). Perkembangan teknologi memberikan peluang untuk mengakses keragaman tersebut berdasarkan data genetik dengan beberapa keunggulan diantaranya tidak terpengaruh fluktuatif terhadap lingkungan dan dapat menunjukkan posisi spesifik keragaman genetik antar spesies yang kemudian dapat dikaitkan dengan keragaman fenotipik (Haristianita 2017).



Gambar 3 Penampilan *Multiple Sequence Alignment* Genom Tanaman Palma yang Menunjukkan adanya Indels dengan Representatif Tiga Variasi Pola Indels yang Berbeda.

Pemilihan pasangan primer dilakukan dengan memperhatikan beberapa hal yaitu suhu T_m tidak jauh berbeda dan posisi *mismatch* berada pada satu sampai empat nukleotida dari situs SNP (Sutanto *et al.* 2013). Posisi *mismatch* adalah satu

nukleotida yang berbeda selain pada situs SNP dari primer *forward* terhadap sekuen aslinya. Posisi *mismatch* dari ujung 3' sangat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi DNA (Bru *et al.* 2008). Semakin dekat *mismatch* dengan ujung 3'

semakin besar kegagalan mendapatkan produk PCR. Berdasarkan hal tersebut, primer SNAP yang dipilih adalah primer dengan posisi *mismatch* paling jauh dari ujung 3'. Setiap situs SNP diperlukan dua pasangan primer, pasangan pertama primer *forward* dan *reverse* untuk alel referensi sedangkan pasangan kedua primer *forward* dan *reverse* untuk alel alternatif. Namun, untuk penggunaan primer reverse hanya akan dipilih satu yang dapat digunakan

primer referensi dan alternatif sekaligus. Hal ini dikarenakan sebagian besar primer reverse yang ditemukan sama dan untuk menghemat pemakaian primer dalam reaksi pada PCR dalam penelitian selanjutnya. Maka dari itu, pada Tabel 4.2 dibawah ini menunjukkan dalam 10 situs SNP dihasilkan 20 pasang primer SNAP terpilih sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan diatas.

Tabel 2 Daftar primer SNAP berdasarkan genom kloroplas kelapa

No.	Id Primer	Sekuens primer	Tm (°C)	Panjang Primer	Ukuran (pb)
1	CT_SNP1_REF	CACATGAGTGGATATATAGGAATCA	53	25	176
	CT_SNP1_ALT	CACATGAGTGGATATATAGGATTCC	54	25	176
	CT_SNP1_REV	ATGTCTCCTACGTTACCCGTAATA	55	24	
2	CT_SNP2_REF	ATGCATAAGGATGTTGTGGTCT	54	25	190
	CT_SNP2_ALT	ACTTAGTTTCCGCCTGGGT	54	20	188
	CT_SNP2_REV	GCATAAGGATGTTGTGGTCC	55	19	
3	CT_SNP3_REF	ACGAAACACTTGGTTTCGATC	55	21	175
	CT_SNP3_ALT	CCACGAAACACTTGGTTTCTATT	56	23	177
	CT_SNP3_REV	GCTATCGGCCAGTGAATA	54	19	
4	CT_SNP4_REF	GCGAGAATTAATTATTGGGCAC	56	22	161
	CT_SNP4_ALT	CAGCGAGAATTAATTATTGGTGAT	55	24	161
	CT_SNP4_REV	CCTCGTTCCTGAAAAGTAGTCA	54	22	
5	CT_SNP5_REF	GAGTCATGGATACAGGAGCCT	54	21	185
	CT_SNP5_ALT	TAAAGATCCTCATTGGTGCG	55	20	184
	CT_SNP5_REV	AGTCATGGATACAGGAGCCC	54	20	
6	CT_SNP6_REF	TCAGTGATCAAATCATTACATACCA	55	24	182
	CT_SNP6_ALT	TTTGTTGGGGATAGAGGGAC	54	23	181
	CT_SNP6_REV	CAGTGATCAAATCATTACATACCC	55	20	
7	CT_SNP7_REF	CATTTTCGTGACTTATTGGTAAATTT	54	24	189
	CT_SNP7_ALT	TTTATCGATATGAGTGTCTATATCA	55	23	189
	CT_SNP7_REV	CATTTTCGTGACTTATTGGTAAATTG	51	20	
8	CT_SNP8_REF	CCAGAAAGAATTCAGTTCAGAAGTA	55	25	180
	CT_SNP8_ALT	CAGAAAGAATTCAGTTCAGAGGTC	55	24	179
	CT_SNP8_REV	CTTTTCCTTCTTCTTGTGCTG	54	22	
9	CT_SNP9_REF	CGGAACAAGTAAACACTATTTTCAA	55	25	178
	CT_SNP9_ALT	GAAATCTCATTCTGACTCATAACTCA	56	26	179
	CT_SNP9_REV	CCGGAACAAGTAAACACTATTTACAG	54	26	
10	CT_SNP10_REF	AAGGTATGGAACCCGAGTAAG	53	21	177
	CT_SNP10_ALT	CCAATACATCGCAGGGTTC	55	22	178
	CT_SNP10_REV	CAAGGTATGGAACCCGAGATAC	56	19	

Marka SNAP adalah teknik molekuler berbasis PCR yaitu mengamplifikasi bagian SNP terseleksi dan bersifat spesifik (Park *et al.* 2007). Total 10 set primer SNAP dikembangkan dari total 9 fragmen sekuen genom CT Cn, KF285453.1 Cn, KX028884.1 Cn, NC_022417 Cn, FJ212316.3 DP, GU811709.2 DP, NC_013991.2 DP,

JF274081.1 OP dan NC_017602.1 OP. Tidak semua keragaman nukleotida dikembangkan untuk diakses menggunakan marka SNAP, hanya 10 titik SNP (lokus) yang mengarah potensial yang terpilih untuk tiap fragmen karena mewakili tiga pola variasi yang sebagian besar ditemukan pada sekuens genom tersebut.

Primer SNAP yang telah didesain

tersebut memiliki suhu annealing sekitar 53-55°C yang mana suhu tersebut termasuk dalam kriteria suhu annealing yang ideal yaitu 50-60°C. Namun pada tahap selanjutnya, semua pasangan primer diuji menggunakan singleplex PCR untuk estimasi suhu annealing yang optimal dan memastikan amplifikasi fragmen yang benar (Sint *et al.* 2012). Pada ukuran primer-primer tersebut berkisar antara 175 pb hingga 190 bp. Hal ini sesuai dengan prinsip teknologi marka SNAP berdasarkan teknik PCR, menggunakan primer spesifik untuk amplifikasi situs-situs SNP pada segmen DNA dengan ukuran berkisar antara 100–500 basa dan hasil amplifikasinya diidentifikasi menggunakan metode standar elektroforesis gel agarosa (Rafalski 2012).

Suatu lokus SNP dianggap potensial jika merupakan mutasi substitusi *synonymous* yaitu merubah pembacaan asam aminonya. Namun situs SNP *non-synonymous* juga dianggap sama-sama memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi marka SNAP terseleksi, karena perbedaan kodon yang berbeda akan menghasilkan sifat protein yang berbeda pula yaitu protein bersifat hidrofobik maupun hidrofilik, sifat masing-masing protein dapat merubah struktur ikatan 3 dimensi protein dan akhirnya berpeluang pula untuk mempengaruhi pengenalan protein terhadap substrat (ekspresi protein/katalisasi enzim sesuai atau tidak

sesuai) (Saito *et al.* 2013; Shastry 2009). Pertimbangan lain seperti posisi antar lokus SNP dan jumlah haplotipe (genotipe khas) yang mampu mengelompokkan genotipe asal sekuen masing-masing menjadi kelompok-kelompok yang unik tersendiri juga dapat menjadi dasar untuk mendelesi SNP yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi marka SNAP.

Desain Primer Indels

Indels merupakan penanda genetik berbasis urutan lainnya seperti SSR dan SNPs dan dikenal sebagai sistem penanda yang efektif untuk analisis genetika pada tanaman karena bersifat multi-allelik dan co-dominant dan distribusi genetika yang luas serta penanda Indel mudah terdeteksi pada skala genom (tingkat gen) (Das *et al.* 2015). Pada dasarnya, prinsip desain primer Indels adalah dengan melihat variasi insersi dan delesi pada sekuens genom yang telah disejajarkan dengan *multiple sequence alignment* dengan menggunakan program GENEIOUS. Selanjutnya terpilih 5 situs InDels yang mewakili tiga variasi pola sekuens dan diolah menggunakan program Primer3plus. Maka dari itu didapatkan lima pasang primer *foward* dan *reverse* tersedia pada Tabel 3 dibawah ini dengan kriteria hampir sama dengan primer SNAP sebelumnya dengan suhu T_m sekitar 51-60°C yang mana suhu tersebut termasuk dalam kriteria suhu annealing yang ideal yaitu 50-60°C.

Tabel 3 Daftar Primer Indels Berdasarkan Genom Kloroplas Kelapa

No	Id Primer	Sekuens primer	T_m (°C)	Panjang Primer	Ukuran (pb)
1	CT_InDels1_F	TTCCATAATCTCATTGTTTT	51.7	21	410
	CT_InDels1_R	ACTGTTTGGATCTGTGTGA	51.8	19	410
2	CT_InDels2_F	GAAAGAGACTTTCATTCCAGTC	56.3	23	410
	CT_InDels2_R	CCAAGGGCTATAGTCATAGTGAT	56.5	23	410
3	CT_InDels3_F	AAACCTTCTATCAACAGGAT	50.4	20	887
	CT_InDels3_R	AAATAGAGGGTAAGTTGAGATCTGT	56.0	25	887
4	CT_InDels4_F	AAGATTTTGTTCAGCATGTTCT	55.7	22	234
	CT_InDels4_R	AAAAGGGCGTGGAACAC	60.0	19	234
5	CT_InDels5_F	AGACGAAGAGAAAGGCTATCC	55.8	22	234
	CT_InDels5_R	TCAAAACACTATGTATGGATGA	53.2	22	234

Namun suhu tersebut perlu dioptimasi kembali pada PCR (*Polymerase Chain Reaction*) agar didapatkan suhu yang sesuai dengan penempelan primer yang optima (Sint *et al.* 2012). Apabila ditemukan *high self / high end self complementary* juga tidak akan dipilih karena primer tersebut akan tidak bisa digunakan.

Validasi Primer SNAP dan Indels

Primer berperan penting dalam

menghasilkan produk amplifikasi karena dipengaruhi oleh karakter primer seperti stabilitas internal, suhu melting, struktur sekunder atau kompetisi antar primer (Sint *et al.* 2012). Kemampuan primer SNAP berdasarkan situs SNPs dan Indels yang telah berhasil dikembangkan perlu diuji. Validasi primer tersebut menggunakan DNA Kelapa Bido dan Kelapa Dalam Morotai melalui PCR. Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan 10 pasang primer tersebut disajikan dalam Gambar 4.



Gambar 4 Hasil amplifikasi 10 primer SNAP terhadap DNA Kelapa Bido dan Kelapa Dalam Morotai. Marker:100pb

Semua primer SNAP berdasarkan situs SNPs menghasilkan produk atau pita yang jelas yang mana pada kedua alel reference dan alternate muncul, kecuali pada primer SNP6 dan SNP9. Pada gambar tersebut alel tidak muncul pada alel reference. Ada dua kemungkinan penyebab alel tersebut tidak muncul. Pertama, DNA tersebut tidak teramplifikasi oleh primer SNP6 dan SNP9. Kedua, terjadi kesalahan teknis dalam pembuatan koktail PCR mix. Untuk mengonfirmasi hal tersebut, maka telah dilakukan validasi ulang. Hasil dari

validasi tersebut menyatakan bahwa muncul pita. Hal ini membuktikan bahwa memang terjadi kesalahan teknis. Hal ini diperkuat dengan uji primer-primer SNP pada 94 aksesi kelapa Bido, Lokal Morotai dan Kelapa Unggul Indonesia.

Hasil amplifikasi pada populasi kelapa tersebut ialah bahwa seluruh aksesi muncul pita pada ukuran sesuai dengan primer masing-masing. Terutama pada SNP6 dan SNP9 yang pada awalnya tidak muncul, maka pada populasi tersebut muncul pita pada alel reference maupun

alternate, contoh profil alel dapat dilihat pada Gambar 6. Genom kloroplas merupakan genom yang bersifat haploid, oleh karena sifat tersebut alel yang muncul

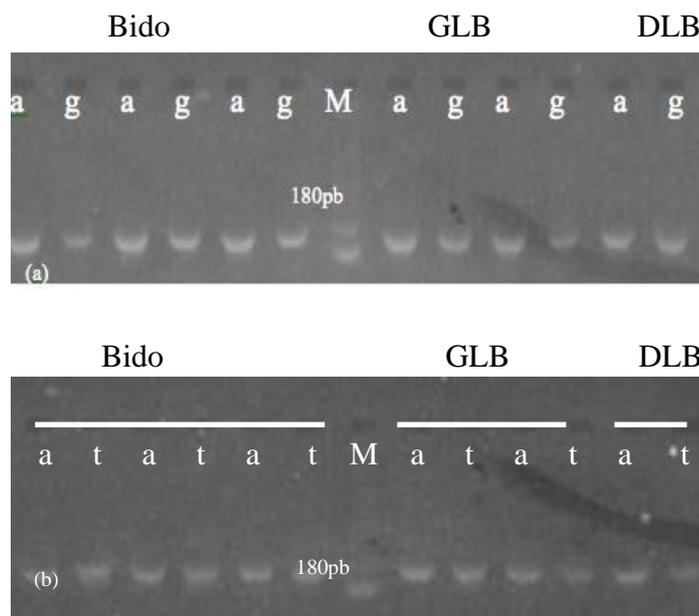
diharapkan hanya salah satu dari alel reference atau alternate. Namun, dalam penelitian ini didapatkan hasil bahwa pita tersebut muncul disemua alel.



Gambar 5 Hasil amplifikasi 5 primer Indels terhadap DNA Kelapa Bido. Marker: 100pb

Ada beberapa hal yang menyebabkan hal demikian yaitu dapat diduga bahwa terdapat genom kloroplas lain yang teramplifikasi dan memiliki motif yang

sama dengan primer yang diuji atau dalam genom kloroplas tersebut telah terjadi mutasi yaitu duplikasi.



Gambar 6 Profil alel hasil amplifikasi populasi Kelapa Morotai menggunakan primer SNP6 (a) dan SNP9 (b). Marker: 100pb

Pada primer Indels, primer yang dapat teramplifikasi hanya primer InDels2 dan InDels4 (Gambar 5) Setelah dilakukan optimasi pada InDels1, InDels3 dan InDels5 pada suhu 45-55°C pita tersebut juga tidak muncul. Penyebab ketiadaan pita tersebut diduga karena pada semua populasi tidak terdapat alel yang merepresentasikan primer tersebut atau ketidaksesuaian suhu pada optimasi. Primer InDels2 dan InDels4 mampu mengamplifikasi seluruh aksesi

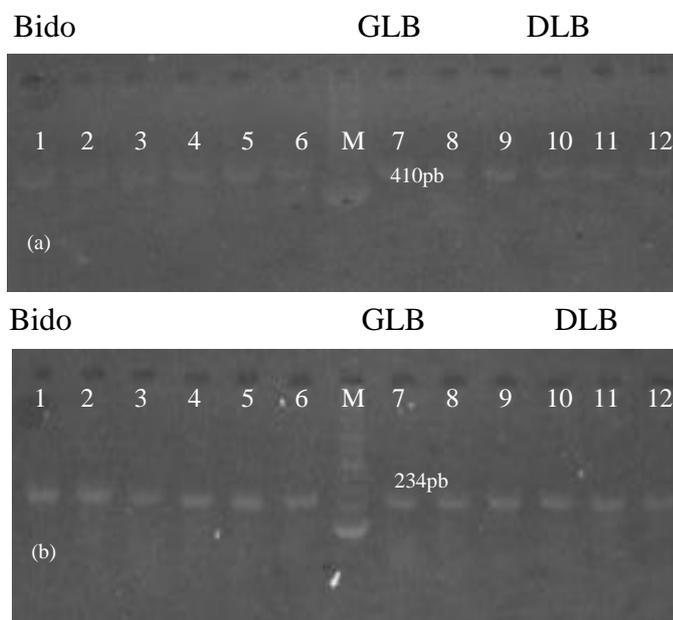
pada populasi kelapa sama halnya dengan primer SNP pada ukuran yang sesuai dengan primer tersebut pada gel agarose 2%.

Pada primer indel perlu dilakukan elektroforesis secara vertikal agar alel dapat terpisah secara sempurna karena beberapa ukuran dari insersi maupun delesi kurang dari 10-20bp (Gambar 7), sehingga jika menggunakan gel agarose tidak mampu memisahkan alel kurang dari 100bp. Oleh

karena itu, proses validasi dilanjutkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 6%.

Visualisasi menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid 6% terhadap 20 aksesori Kelapa Morotai dengan

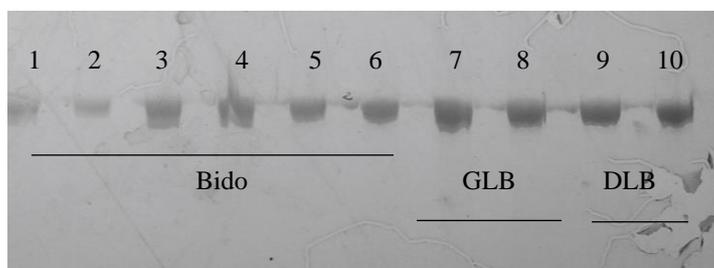
pewarnaan perak nitrat telah dilakukan pada primer InDels2. Hasil dari elektroforesis tersebut juga menunjukkan bahwa terdapat satu pita yang muncul pada ukuran yang sama yaitu 410pb (Gambar 7).



Gambar 7 Profil alel hasil amplifikasi populasi Kelapa Morotai menggunakan primer Indel2 (a) dan Indel4 (b). Marker: 100pb

Berdasarkan empat genom kloroplas kelapa yang berasal dari Huang *et al.* (2013), bank gen NCBI dan *personal communication* (Tabel 1) pada dasarnya terdapat dua jenis haplotipe yang berbeda (Gambar 1 dan Gambar 2). Selanjutnya, dari haplotipe berbeda tersebut diuji ke 94 aksesori kelapa Indonesia. Keberadaan pita-pita tersebut membuktikan bahwa semua aksesori kelapa yang diuji mempunyai sekuens kloroplas yang sama.

Representasi kelapa dengan kloroplas tipe yang lain tidak ditemukan dalam sampel kelapa yang diuji. Hal ini dapat diduga bahwa dari DNA kloroplas kelapa yang diuji hanya merupakan representasi salah satu dari haplotipe kloroplas yang ada. Untuk mengonfirmasi kelapa yang diuji merupakan representasi haplotipe yang mana maka perlu dilakukan sequencing untuk target DNA yang dievaluasi.



Gambar 8 Profil alel hasil amplifikasi Kelapa Morotai menggunakan primer Indel2 dengan elektroforesis gel akrilamid 6%

KESIMPULAN

Berdasarkan sembilan sekuens genom kloroplas pada tanaman palma, telah berhasil didisain 10 primer berdasarkan situs SNP dan 5 primer berdasarkan situs

insersi delesi. Hasil validasi primer tersebut menggunakan DNA kelapa Indonesia didapatkan hasil bahwa 10 primer SNP berhasil teramplifikasi sedangkan indels hanya 2 primer berbasis PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Batugal P, Rao VR, Oliver J, editors. 2005. *Coconut Genetic Resources*. Serdang (MY). International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO).
- Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16s rRNA gene as an example. *App Env Microbiol*. 74(5):1660-1663.
- Das S, Upadhyaya HD, Srivastava R, Bajaj D, Gowda CLL, Sharma S, Singh S, Tyagi AK, Parida SK. 2015. Genome-wide insertion–deletion (InDel) marker discovery and genotyping for genomics-assisted breeding applications in chickpea. *DNA Research*. 22:377-386.
- Dauby G, J Duminil, M Heuertz, O. J. Hardy. 2010. Chloroplast DNA Polymorphism and Phylogeography of a Central African Tree Species Widespread in Mature Rainforests: *Greenwayodendron suaveolens* (Annonaceae). *J Tropical Plant Biol*. 3:4–13.
- Ganal MW, Altmann T, Roder MS. 2009. SNP identification in crop plant. *Curr Opin Plant Biol*. 12: 211-217.
- Gunn BF 2016. Phylogenomics of Coconut (*Cocos nucifera*). [Disertasi]. Canberra (AU): The Australian National University.
- Haristianita MD. 2017 Gen Terkait Warna Bunga: Pemanfaatannya untuk Pengembangan Marka Molekuler dan Analisis Genetik Warna Bunga Phalaenopsis. [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Huang LS, Sun YQ, Jin Y, Gao Q, Hu XG, Gao FL, Yang XL, Zhu JJ, El-Kassaby Y, Mao JF. 2018. Development of high transferability cpSSR markers for individual identification and genetic investigation in Cupressaceae species. *Ecol and Evol*. 8: 4967–4977.
- Huang Y, Matzke AJM, Matzke M. 2013. Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of coconut palm (*Cocos nucifera*). *Plos One* 8(8):
- Hu J, Gui S, Zhu Z, Wang X, Ke W, Ding Y. 2015. Genome- wide identification of SSR and SNP markers based on whole-genome resequencing of a Thailand wild sacred lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plos One*. 1-17.
- Jia SW, Zhang ML, Raab-Straube EV, Thulin M. 2016. Evolutionary history of *Gymnocarpus* (Caryophyllaceae) in the arid regions from North Africa to Central Asia. The Linnean Society of London, Biological Journal of the Linnean Society.
- Larekeng SH, Maskromo I, Purwito A, Mattjik NA, Sudarsono. 2015. Pollen dispersal and pollination patterns studies in Pati kopyor coconut using molecular markers. *Intl J Coconut Res Dev*. 31(1): 46-60.
- Loiola CM. Azevedo AON, Diniz LEC, Aragão WM, Azevedo CDO, Santos PHAD, Ramos HCC, Pereira MG, Ramos SRR. 2016. Genetic relationships among tall coconut palm (*Cocos nucifera* L.) accessions of the international coconut genebank for Latin America and the Caribbean

- (ICG-LAC), evaluated using microsatellite markers (SSRs). *Plos One*. 11(3):1-11.
- Novarianto H. 2010. Karakteristik bunga dan buah hasil persilangan kelapa hibrida genjah x genjah. *Buletin Palma*. 39:100-110.
- Park J, Park BY, Kim HS, Lee JE, Suh I, Nam CM, Beaty TH. 2007. *MSX1* Polymorphism Associated with Risk of Oral Cleft in Korea: Evidence from Case-Parent Trio and Case-Control Studies. *J Yonsei Med*, 48(1):101.
- Peterson GW, Dong Y, Horbach C, Fu YB. 2014. Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: a lab guide for SNP genotyping. *Diversity*. 2014(6):665-680.
- Pesik A. 2016. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kelapa Indonesia dan Penentuan Identitas Kelapa Hibrida Berdasarkan Marka Molekuler. [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Rafalski A. 2012. Application of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol*. 5:94-100.
- Ren J, Sun D, Chen L, You FM, Wang J, Nevo E, Sun D, Luo MC, Peng J, Peng Y. 2013. Genetic diversity revealed by single nucleotide polymorphism markers in a worldwide germplasm collection of durum wheat. *Intl J Mol Sci*. 14: 7061-7088.
- Sutanto A, Hermanto C, Sukma D, Sudarsono. 2013. Development of SNAP marker based on resistance gene analogue genomic sequences in banana (*Musa spp.*) [In Indonesia]. *J Horti*. 23(4):300-309.
- Sint D, Raso L, Traugott M. 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol*. 2012(3):898-905.
- Tinche. 2014. Keragaman Genetik Kelapa Sawit Asal Nigeria dan Asosiasi Marka Mikrosatelit (SSR) dengan Karakter *Virescens*. [Disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Yang M, Zhang X, Liu G, Yin Y, Chen K, et al. (2010) The complete chloroplast genome sequence of date palm (*Phoenix dactylifera L.*). *PloS ONE* 5: e12762.