

## **ANALISIS KEANEKARAGAMAN KULTIVAR PISANG MENGGUNAKAN PENANDA PCR-RFLP PADA INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) DNA RIBOSOM**

**T.W.D. Ekasari, A. Retnoningsih<sup>✉</sup>, T. Widiati**

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### **Info Artikel**

*Sejarah Artikel:*

Diterima 1 Februari 2012

Disetujui 29 Maret 2012

Dipublikasikan April 2012

*Keywords:*

Internal transcribed spacers

(ITS)

Musa

PCR-RFLP

### **Abstrak**

Pisang merupakan bahan makanan pokok keempat terpenting di negara berkembang yang memiliki keanekaragaman sangat tinggi. Penanda DNA mikrosatelit dapat membedakan kultivar pisang yang memiliki genom A dengan kultivar pisang bergenom B. Namun penanda mikrosatelit memiliki beberapa keterbatasan, yaitu membutuhkan primer spesifik dan membutuhkan preparasi yang lebih rumit, sehingga membutuhkan waktu dan biaya yang cukup mahal. Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) terhadap DNA internal transcribed spacer (ITS) ribosom mampu mengklasifikasikan kultivar-kultivar pisang berdasarkan pita restriksi daerah ITS yang dipotong dengan enzim RsaI. Koleksi DNA dari 15 kultivar pisang di Laboratorium Genetika dan Molekular Jurusan Biologi UNNES sudah diklasifikasikan genomnya berdasarkan mikrosatelit. DNA kultivar pisang diamplifikasi menggunakan primer ITS L dan ITS 4 menghasilkan fragmen ITS sebesar 700 pb. Pemotongan fragmen ITS DNA ribosom dengan enzim RsaI menghasilkan fragmen 530 pb yang spesifik untuk genom A, fragmen 350 pb dan 180 pb spesifik untuk genom B. Hasil perbandingan klasifikasi genomik berdasarkan mikrosatelit dan PCR-RFLP dari daerah ITS DNA ribosom menunjukkan bahwa klasifikasi genomnya serupa.

### **Abstract**

*Banana is the fourth most important staple foods in developing countries which has very high diversity. Microsatellite markers can be able to differentiate bananas cultivars which have A and B genomes, but this marker has restrictions. It requires a specific primer which is takes time and the costs expensive enough. Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) was able to classify banana cultivars based on the restriction band ITS regions cut by RsaI enzyme. The DNA collection from 15 banana cultivars from the Laboratory of Genetics and Molecular Biology Department of Biological Science UNNES have been classified its genome based on microsatellite. Banana cultivar amplified using the primers ITS L and ITS 4 produce ITS fragment at 700 bp. The cutting of ribosomal DNA ITS fragments by RsaI enzyme produce 530 bp fragment that was unique for the A genome, the other fragment 350 bp and 180 bp genome are unique for the B genome. Comparison result of genomic classification based on microsatellite and PCR-RFLP of ribosomal DNA ITS regions showed that the genome classification was similar.*

© 2012 Universitas Negeri Semarang

<sup>✉</sup>Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lantai 1 FMIPA Unnes

Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang, 50229

E-mail: aminrm2010@yahoo.com

## Pendahuluan

Pisang merupakan bahan makanan pokok keempat terpenting di negara berkembang (Tripathi 2003), dan salah satu pusat asal kelompok pisang adalah Indonesia (Nasution & Yamada 2001). Pisang merupakan tanaman hortikultura dengan tingkat produksi cukup tinggi di Indonesia yang cenderung meningkat dari tahun ke tahun. Namun selama ini potensi tersebut belum dimanfaatkan secara optimal. Buah pisang juga memiliki banyak manfaat kesehatan, dengan demikian pisang juga merupakan salah satu bahan pangan yang mampu meningkatkan gizi masyarakat.

Sudarnadi (1995) menyebutkan bahwa kultivar pisang konsumsi merupakan keturunan dari dua jenis tetua pisang liar yaitu *Musa acuminata* (genom AA) dan *Musa balbisiana* (genom BB). Persilangan tersebut menimbulkan berbagai variasi genetika melalui beberapa proses yang berperan penting dalam evolusi tanaman pisang. Evolusi terjadi melalui berbagai cara, antara lain mutasi (INIBAP 2003), seleksi manusia (Kaemmar *et al.* 1997), dan persilangan sendiri di dalam jenis, antar jenis, atau persilangan balik dengan induknya (Simmonds 1995).

Evolusi dari pisang liar menghasilkan kultivar pisang pada berbagai tingkat ploidi dengan variasi kombinasi genom AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, ABBB, AAAB, dan AABB (Stover & Simmonds 1987; Pillay *et al.* 2006), serta genom BBB yang diturunkan dari jenis pisang liar bergenom BB (Valmayor *et al.* 2000).

Poliploidi pada pisang dapat bersifat autoploid (AAA), maupun allopoloid (AAB dan ABB) (Simmonds & Shepherd 1955). Genom A maupun genom B sangat bervariasi. Hal ini dapat dilihat dari ukuran kromosom (Chikmawati *et al.* 1998), kandungan flavonoids dan isozim (Horry 1989), pola isozim (Jarret & Litz 1986a; Jarret & Litz 1986b; Megia *et al.* 2001), kandungan DNA pada kloroplas (Gawel & Jarret 1991a), DNA sitoplasmik (Gawel & Jarret 1991b), sampai DNA mikrosatelit (Retnoningsih *et al.* 2009). Secara sitogenetika ukuran genom A pada *M. acuminata* berkisar 591-651 Mbp, lebih besar dari ukuran genom B pada *M. balbisiana* sebesar 537 Mbp (Lysak *et al.* 1999). Oleh karena itu *M. acuminata* secara morfologi dan sitologi paling sedikit memiliki delapan *subspecies*. Hal ini juga menjelaskan bahwa genom kultivar pisang yang sama belum tentu mempunyai ekspresi fenotip yang sama (Megia 2005).

Secara sederhana telah dilakukan analisis

keanekaragaman genetik kultivar pisang berdasarkan morfologi (Jumari & Pudjoarinto 2000; Siddiqah 2002). Penanda morfologi relatif mudah diidentifikasi tetapi ekspresinya dipengaruhi oleh lingkungan (Rao 2004). Selain itu, penanda morfologi sulit digunakan untuk membedakan klon atau jenis yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat (Darmono 1996a).

Penanda yang lain untuk analisis keanekaragaman genetik kultivar pisang misalnya isozim (Megia *et al.* 2001). Penanda ini berdasarkan perbedaan muatan molekul protein dari jaringan tanaman. Ada 100 kultivar pisang bergenom AA, AAA, AAB, ABB, dan BB yang mampu dianalisis menggunakan isozim malat dehidrogenase (MDH), peroksidase (PRX), dan glutamat oksaloasetat transaminase (GOT) dengan profil isozim spesifik sebanyak 16 untuk MDH, 20 untuk PRX, dan 8 untuk GOT. Penanda ini lebih efektif dari penanda morfologi, namun memiliki beberapa keterbatasan seperti diperoleh dari jaringan tanaman dengan asal dan umur yang sama karena beberapa sistem enzim tertentu dipengaruhi oleh regulasi perkembangan jaringan.

Seiring perkembangan era teknologi yang semakin maju, analisis keanekaragaman genetik yang lebih tepat dapat dilakukan menggunakan penanda molekuler. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan penyusun utama dari sel makhluk hidup, perbedaan basa pada DNA dapat digunakan sebagai penanda dari spesies tertentu dalam suatu analisis keanekaragaman untuk tujuan pengembangan sistem pemuliaan berbasis molekuler (Solihin 2005).

DNA pada tanaman terdapat di dalam inti sel, mitokondria dan kloroplast (Sulandari & Zein 2003). Pemanfaatan DNA dalam analisis keanekaragaman genetik pada umumnya dikelompokkan menjadi dua tipe, yaitu a) berdasarkan hibridisasi DNA-DNA yang dipotong dengan enzim restriksi, seperti *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) dan *polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP), dan b) *random amplification of polymorphism DNA* (RAPD), dan mikrosatelit (Yunus 2004).

Sekuen DNA telah banyak digunakan dalam penelitian filogeni karena telah terbukti menunjukkan hubungan kekerabatan yang lebih alami. Penanda DNA menyediakan banyak ciri karena perbedaan laju perubahan basa-basa nukleotida di dalam lokus yang berbeda (Hidayat *et al.* 2008). Mikrosatelit sebagai salah satu analisis penanda dalam penentuan

genom A dan B pada kultivar pisang, memiliki kelemahan yaitu primer spesifik yang digunakan pada penanda mikrosatelit belum tersedia pada semua jenis tanaman (Kaemmer *et al.* 1997), sehingga diperlukan perancangan untuk kajian tanaman yang primer spesifiknya belum tersedia (Azrai 2005).

Penanda DNA mikrosatelit dapat membedakan kultivar pisang yang memiliki genom A dengan kultivar pisang bergenom B (Kaemmer *et al.* 1997; Retnoningsih *et al.* 2009). Penanda ini memiliki beberapa keterbatasan, yaitu membutuhkan primer spesifik dan membutuhkan preparasi yang lebih rumit, sehingga membutuhkan waktu dan biaya yang cukup mahal. Oleh sebab itu diperlukan suatu metode analisis keanekaragaman pisang yang lebih efisien dari segi waktu dan biaya.

Penanda molekuler lain, RAPD dengan tiga primer 10-mer (A17, A18, dan D10) menghasilkan pola pita yang spesifik pada *M. acuminata* maupun *M. balbisiana*. Primer A17 mengamplifikasi dua pita, yaitu 200 bp dan 100 bp. Primer D10 menghasilkan satu pita berukuran 320 bp yang hanya ditemukan pada *M. acuminata*. Primer A18 menghasilkan tiga pita, yaitu 200 bp, 250 bp, dan 300 bp yang spesifik untuk *M. balbisiana* (Pillay *et al.* 2000).

Daerah ITS sering digunakan para ahli untuk analisis filogenetik molekuler pada tumbuhan dalam rangka memahami keanekaragaman dan menjawab beberapa masalah filogenetika. Hal ini karena daerah ITS memiliki karakteristik unggul, yaitu berukuran kecil (kurang lebih 700 bp) dan memiliki salinan yang banyak di dalam genom inti. Karakteristik ini menyebabkan daerah ITS mudah untuk diisolasi, diamplifikasi, dan dianalisis (Hidayat *et al.* 2008), serta memiliki derajat konservasi pada setiap komponennya (Darmono 1996b).

Penggunaan penanda ini dengan metode PCR-RFLP dapat membedakan genom kultivar pisang di Afrika. Kultivar pisang diamplifikasi menggunakan primer ITS L dan ITS 4, menghasilkan pita 700 bp. Pemotongan menggunakan enzim *RsaI* menghasilkan satu pita spesifik 530 bp pada pisang bergenom A dan dua pita spesifik 350 bp dan 180 bp pada pisang bergenom B (Nwakanma *et al.* 2003). Hasil pemotongan menggunakan enzim *RsaI* pada sampel pisang di Afrika didapati tujuh genom pisang yaitu, AA, AAA, BB, ABB, AAB, AAAB, dan AABB.

Analisis keanekaragaman genetik menggunakan metode PCR-RFLP pada ITS DNA ribosom lebih efektif karena hanya membutuhkan

primer universal dan dengan teknik lebih sederhana sehingga membutuhkan waktu yang lebih singkat. Oleh karena itu, selain memberikan informasi keanekaragaman genetik, metode ini dapat digunakan untuk meninjau ulang klasifikasi genom kultivar pisang berdasarkan penanda mikrosatelit (Retnoningsih *et al.* 2009).

## Metode

Pemeriksaan DNA genom, amplifikasi PCR dan pemotongan daerah ITS menggunakan enzim *RsaI* dilakukan di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekular Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah DNA dari 15 kultivar pisang koleksi Laboratorium Genetika dan Biologi Molekular Jurusan Biologi FMIPA UNNES yang diisolasi menggunakan metode Dixit dan telah diklasifikasikan genomnya berdasarkan mikrosatelit (Tabel 1).

Amplifikasi daerah ITS dilakukan dengan mencampurkan 100 ng DNA; masing-masing 0,5 µl primer ITS L 5' TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGG3' dan ITS 4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'; 15 mM MgCl<sub>2</sub>, kemudian ditambah masing-masing 200 µl dTTP, dCTP, dGTP, dATP dan enzim *Taq polymerase* (Biotechnology, Surrey, U.K.). Larutan *buffer* yang terdiri atas 75 mM Tris HCl (pH 8,9), dan 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ditambahkan ke campuran.

Rangkaian proses amplifikasi DNA target terdiri atas tahap denaturasi DNA menjadi untai tunggal selama 4 menit pada suhu 94°C, diikuti 35 siklus yang terdiri atas denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 48°C, dan ekstensi selama 1 menit pada suhu 72°C. Ekstensi akhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 72°C. Hasil amplifikasi kemudian diperiksa menggunakan elektroforesis gel agarose dengan konsentrasi 1,2%.

Fragmen hasil amplifikasi pada daerah ITS kemudian dipotong menggunakan enzim *RsaI* yang akan menghasilkan beberapa fragmen tertentu (Nwakanma *et al.* 2003). Enzim *RsaI* bekerja secara optimum pada suhu 37°C dan memotong DNA pada situs GTAC, 1 unit enzim *RsaI* kurang lebih mampu mendigesti 1 µg DNA target. Hasil pemotongan diperiksa menggunakan elektroforesis dengan konsentrasi 2% menggunakan *buffer* TBE (90 mM Tris, 90 mM asam borat, 2,5 M EDTA, pH 8,3).

## Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan DNA genom dari 15 kultivar pisang menunjukkan pita dengan bentuk

kompak tanpa *smear*. Kultivar Ampyang dan Angkleng menunjukkan pendaran pita yang lebih tipis bila dibandingkan kultivar yang lain. Pendaran pita menunjukkan jumlah DNA, semakin tebal pita menunjukkan jumlah DNA genom semakin banyak. Hasil elektroforegram DNA genom dari 15 kultivar pisang dapat dilihat pada Gambar 1. Pemeriksaan dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA yang telah disimpan sebelum dilakukan proses PCR. DNA berkualitas baik diketahui dari pita yang kompak dan tidak terdapat *smear*, *smear* merupakan DNA yang terpotong-potong dan berukuran kecil. Hasil pemeriksaan DNA menunjukkan kualitas DNA yang cukup baik untuk proses PCR. Kualitas DNA mempengaruhi DNA target yang diinginkan. Analisis ketebalan pita-pita DNA perlu dilakukan secara kuantitatif menggunakan realtime PCR.

Kualitas koleksi DNA yang baik, dapat disebabkan adanya beberapa faktor, antara lain penyimpanan DNA menggunakan *buffer* Tris EDTA (TE), dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Penyimpanan DNA dalam jangka waktu yang lama dapat berpengaruh terhadap kualitas DNA, penyimpanan DNA pada *buffer* TE mampu menjaga kestabilan DNA bila dibanding penyimpanan dengan *double destilate*  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ). DNA memiliki sifat asam lemah (*deoxyribonucleic acid*) sehingga dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan degradasi DNA oleh DNAase yang aktif pada pH yang sedikit asam. *Buffer* TE pH 8 mampu menjaga kestabilan DNA dalam jangka waktu yang cukup lama bila dibandingkan  $\text{ddH}_2\text{O}$  (Kasper & Lenz 2004). Selain itu, penyimpanan pada suhu dingin atau beku lebih efektif untuk mempertahankan DNA. Zetzsche & Gemeinholzer (2009) menyebutkan penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  lebih baik dibandingkan pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$ . Penggunaan *aliquot* dalam tiap pengambilan DNA lebih dianjurkan karena proses *thawing* yang berulang-ulang akan mempengaruhi DNA.

DNA genom selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer ITS L dan ITS 4. Hasil amplifikasi daerah ITS DNA ribosom pada 15 sampel menunjukkan pita berukuran 700 bp dengan *marker* 50 bp (Gambar 2). Daerah ITS merupakan daerah yang sering digunakan dalam analisis keanekaragaman baik tumbuhan maupun jamur. Sekuensing daerah ITS banyak dimanfaatkan untuk analisis sistematik molekular di tingkat spesies, karena daerah ITS memiliki derajat variasi yang tinggi.

Hasil amplifikasi dipotong menggunakan enzim *RsaI*. Pemotongan fragmen ITS DNA ribosom oleh enzim *RsaI* menghasilkan fragmen-

fragmen potongan dengan ukuran tertentu (Gambar 3). Amplifikasi daerah ITS DNA ribosom menghasilkan tiga ribu juta lebih salinan fragmen ITS DNA ribosom. Enzim *RsaI* akan mengenali urutan basa GTAC sebagai tempat pemotongan, kemudian memotongnya menjadi lima fragmen dengan ukuran 530 bp, 350 bp, 180 bp, 120 bp, dan 50 bp. Fragmen 530 bp ditemukan pada kultivar yang bergenom A, sehingga fragmen tersebut bersifat spesifik sebagai penanda genom A pada sampel kultivar. Pada kultivar yang bergenom B, fragmen 530 bp dikenali lagi oleh enzim sehingga fragmen tersebut terpotong lagi menjadi dua fragmen dengan ukuran 350 bp dan 180 bp yang bersifat spesifik untuk sampel yang memiliki genom B (Nwakanma *et al.* 2003).

Pengklasifikasian kultivar yang terdiri dari genom A dan B didasarkan pada fragmen berukuran 530 bp, 350 bp, dan 180 bp. Kultivar yang bergenom ABB memiliki ketiga fragmen tersebut, begitu pula dengan kultivar bergenom AAB, yang membedakannya adalah ketebalan atau intensitas dari pendaran pita hasil pemotongan. Pada kultivar pisang yang bergenom ABB, pendaran pita pada 350 bp dan 180 bp akan lebih tebal bila dibandingkan kultivar dengan genom AAB.

Jumlah fragmen ITS DNA ribosom yang lebih dari 700 bp pada kultivar yang bergenom ABB maupun AAB dimungkinkan karena beberapa sebab, yaitu a) waktu inkubasi pemotongan ITS DNA ribosom oleh enzim *RsaI* yang kurang lama sehingga menghasilkan fragmen potongan yang kurang sempurna pada fragmen 530 bp menjadi 350 bp dan 180 bp, b) kromosom homolog yang mengalami amplifikasi pada tiap kromosomnya belum tentu berisi basa-basa yang sama, sehingga saat dipotong oleh enzim *RsaI*, kromosom yang mengandung genom B memiliki situs yang dikenali lagi oleh enzim *RsaI* pada fragmen 530 bp sehingga akan terjadi pemotongan lagi menjadi fragmen berukuran 350 bp dan 180 bp. Pada kromosom pembawa genom A, situs pemotongan tersebut tidak ditemukan, hal ini mengakibatkan kultivar dengan genom ABB memiliki fragmen 350 bp dan 180 bp dengan pendaran pita yang lebih tebal dibandingkan kultivar dengan genom AAB. Hal ini juga terkait dengan hibridisasi tetua atau induk dari pisang yang memiliki genom ABB dan AAB. Kelompok ABB dan AAB merupakan hasil persilangan antara *M. acuminata* (AA) dan *M. balbisiana* (BB) menghasilkan keturunan hibrid AB. Hibrid AB kemudian bersilang dengan jenis liar atau kultivar genom AA maupun BB menghasilkan genom AAB dan ABB (Valmayor *et*

al. 2000).

Penentuan genom AA dan AAA menggunakan penanda ini belum dapat dilakukan, karena untuk membedakan kultivar yang bergenom diploid dan triploid tidak didapati pita atau ciri yang bersifat spesifik. Hal ini juga terjadi pada penanda mikrosatelit, sehingga untuk mendapatkan keakuratan genom pisang yang diploid dan triploid diperlukan uji menggunakan penanda lain. Untuk menentukan tingkat ploidi yang lebih akurat dapat dilakukan analisis sitometri yang sensitif untuk membedakan tingkat ploidi, tetapi kurang sensitif membedakan komposisi genom poliploid (Dolezel *et al.* 2004).

Kultivar pisang yang bergenom AAB adalah Kapal, Raja Sableng, Lase, dan Solok. Kepok Awu, Raja Bandung, Prabumulih dan Sobo Londoh Putih bergenom ABB. Hasil pengklasifikasian genom kultivar pisang berdasarkan PCR-RFLP pada ITS DNA ribosom (Tabel 2), menunjukkan bahwa kultivar Nona dan Lampung bergenom AA, sedangkan Barley dan Ketip Gunung Sari bergenom AA/AAA. Angleng dan Poto bergenom AAA. Pengklasifikasian tersebut didasarkan pada penanda mikrosatelit (Retnoningsih *et al.* 2009).

Pengklasifikasian 15 kultivar pisang berdasarkan fragmen ITS DNA ribosom menghasilkan dendogram dengan nilai koefisien kemiripan antara 0,804-1,00 (Gambar 4). Tingkat keanekaragaman ditentukan oleh nilai koefisien kemiripan, semakin besar nilai koefisien kemiripan, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar kultivar.

Dendogram menunjukkan 15 kultivar tersebut dibagi menjadi tiga kelompok, 1) kultivar Kapal, Prabumulih, Raja Sableng, dan Lase masuk kedalam kelompok dengan genom AAB dan berkerabat dekat dengan kelompok genom ABB. 2) kultivar Sobo Londoh Putih, Kepok Awu, Raja Bandung dan Prabumulih masuk dalam kelompok ini. 3) bergenom AA/AAA memiliki hubungan kekerabatan yang cukup jauh dengan kelompok genom AAB dan ABB, hal ini ditunjukkan oleh koefisien kemiripan yang cukup jauh.

Berdasarkan penanda morfologi, kultivar Raja Bandung termasuk pisang meja, memiliki ukuran buah sedang, bentuk buah membulat dan kulit buah tipis. Kultivar Kepok Awu termasuk ke dalam grup Kepok yang memiliki ciri ukuran buah sedang, penampang melintang buah sangat persegi, kulit buah tebal dan daging buah berwarna kuning apabila telah masak. Subgrup Sobo salah satunya Sobo Londoh Putih, termasuk buah olahan, memiliki ukuran buah sedang-

panjang dan daging buah akan berwarna putih-krem apabila telah masak (Jumari & Pudjoarinto 2000).

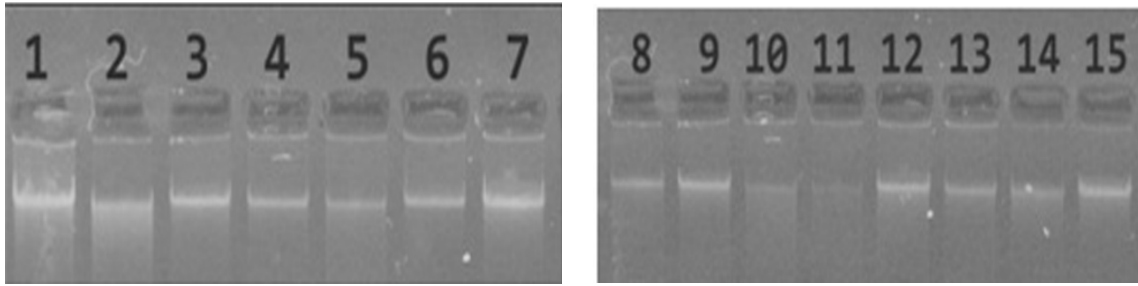
Penentuan genom menggunakan metode PCR-RFLP pada daerah ITS DNA ribosom lebih sederhana dan lebih mudah dilakukan, hal ini karena primer yang digunakan bersifat universal, sehingga amplifikasi yang dilakukan lebih mudah dan efisien. Pada mikrosatelit, primer yang digunakan bersifat spesifik sehingga perlu dilakukan pembuatan primer yang sesuai dan membutuhkan waktu dan biaya yang relatif lebih mahal. Kemurnian DNA sebagai cetakan dalam proses PCR pada penanda mikrosatelit membutuhkan kemurnian yang sangat tinggi, sehingga dengan DNA genom yang telah disimpan dalam jangka waktu cukup lama kemungkinan daerah mikrosatelit untuk teramplifikasi sangat rendah (Retnoningsih komunikasi pribadi 2011).

Perbandingan genom yang didasarkan pada PCR-RFLP daerah ITS DNA ribosom dan mikrosatelit dapat dilihat pada Tabel 3. Klasifikasi genom kultivar pisang didasarkan pada pita hasil pemotongan daerah ITS DNA ribosom, penentuan genom kultivar diperoleh dari pita spesifik yang didapati dari hasil potongan. Kultivar pisang yang hanya memiliki pita spesifik untuk genom A dapat digolongkan menjadi kelompok genom AA atau AAA, pada hasil klasifikasi kultivar Nona dan Lampung menjadi kelompok AA, kultivar Barley dan Ketip Gunung Sari menjadi kelompok genom AA/AAA dan kultivar Ampyang, Angleng, dan Poto menjadi kelompok AAA, hal ini didasarkan pada pengelompokan genom berdasarkan penanda mikrosatelit. Pada kultivar yang memiliki pita spesifik untuk genom A dan B, genomnya ditentukan menjadi kelompok AAB dan ABB bukan AABB atau ABBB hal ini juga ditentukan berdasarkan rujukan pengelompokan berdasarkan penanda mikrosatelit (Retnoningsih *et al.* 2009).

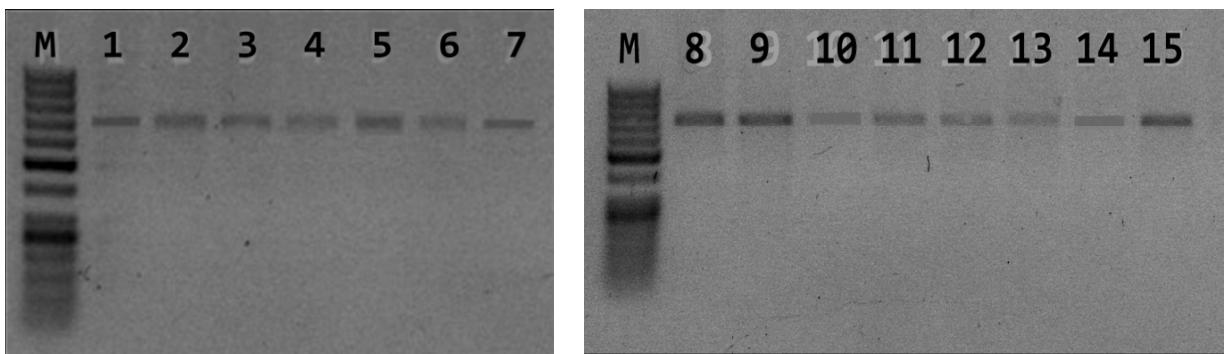
Hasil perbandingan genom kultivar pisang menggunakan penanda mikrosatelit dan penanda PCR-RFL daerah ITS DNA ribosom menunjukkan genom yang sama. Hal ini menunjukkan pemanfaatan penanda PCR-RFLP yang didasarkan pada pemotongan daerah ITS DNA ribosom menggunakan enzim *RsaI* mampu mengklasifikasikan genom kultivar pisang dengan cara yang lebih sederhana dan lebih efisien dalam hal biaya dan waktu.

## Simpulan

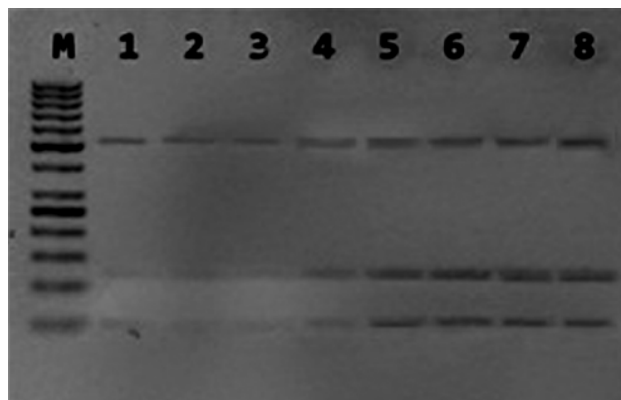
Simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah terdapat keanekaragaman



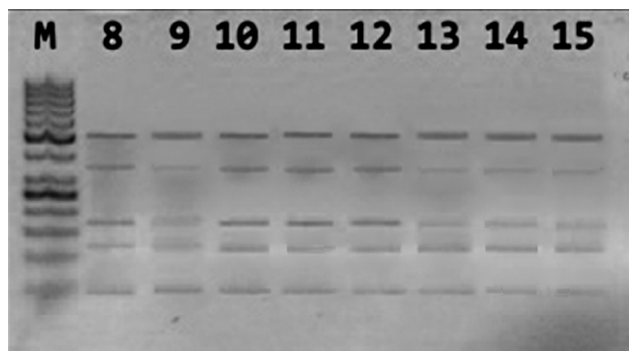
**Gambar 1.** Elektroforegram DNA genom pada gel agaros 0,8%. 1.Kapal, 2. Raja sableng, 3. Lase, 4. Raja solok, 5. Sobo londoh putih, 6. Kepok awu, 7. Raja bandung, 8. Prabumulih, 9. Ketip gunung sari, 10. Ampyang, 11. Angkleng, 12. Poto, 13. Barley, 14. Nona, 15. Lampung.



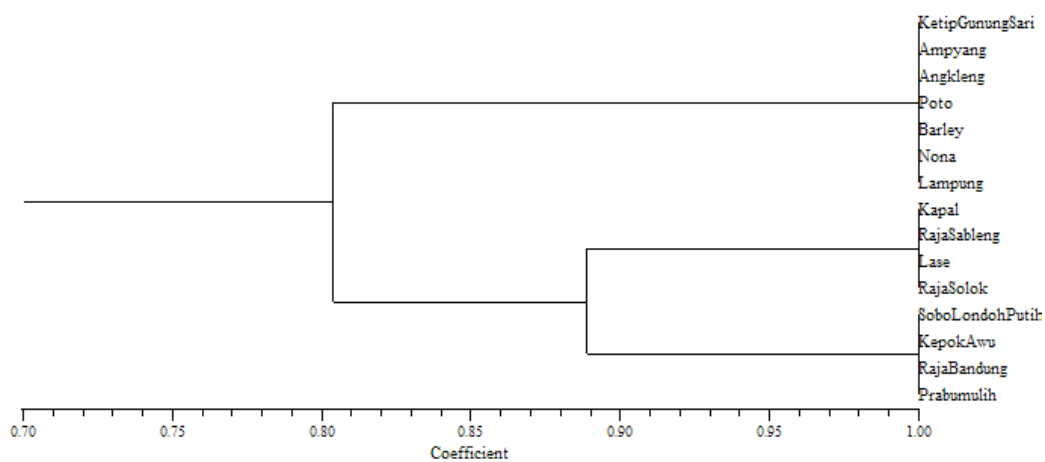
**Gambar 2.** Elektroforegram produk PCR pada gel agaros 1,2%. 1. Ketip gunung sari, 2. Ampyang, 3. Angkleng, 4. Poto, 5. Barley, 6. Nona, 7. Lampung, 8. Kapal, 9. Raja sableng, 10. Lase, 11. Raja solok, 12. Sobo londoh putih, 13. Kepok awu, 14. Raja bandung, 15. Prabumulih.



**Gambar 3a.** Elektroforegram hasil pemotongan daerah ITS DNA ribosom menggunakan enzim RsaI pada agaros 2%. M: Marker, 1: Ketip gunungsari (AA/AAA), 2: Ampyang (AAA), 3: Angkleng (AAA), 4: Poto (AAA), 5: Barley (AA), 6: Nona (AA), 7: Lampung (AA).



**Gambar 3b.** Elektroforegram hasil pemotongan daerah ITS DNA ribosom menggunakan enzim RsaI pada agaros 2%. M: Marker, 8: Sobo londoh putih (ABB), 9: Kapal (AAB), 10: Kepok awu (ABB), 11: Raja bandung (ABB), 12: Prabumulih (ABB), 13: Raja sableng (AAB), 14: Lase (AAB), 15: Raja solok (AAB).



**Gambar 4.** Dendogram 15 kultivar pisang berdasarkan penanda PCR-RFLP pada ITS DNA ribosom

**Tabel 1.** Klasifikasi genom kultivar pisang berdasarkan penanda mikrosatelit

Kultivar pisang	Genom berdasarkan mikrosatelit	Asal koleksi
Barley	AA/AAA	Diperta
Nona	AA	Diperta
Lampung	AA	PKBT
Ketip Gunung Sari	AA/AAA	PKBT
Ampyang	AAA	Diperta
Angkleng	AAA	PKBT
Poto Yogya	AAA	PKBT (Yogyakarta)
Kapal	AAB	PKBT (Tasik malaya)
Raja Sableng	AAB	PKBT
Lase Solok	AAB	PKBT
Sobo Londoh Putih	AAB	Diperta
Kepok Awu	ABB	Diperta
Raja Bandung	ABB	Diperta
Prabumulih	ABB	PKBT
Kepok Klutuk	ABB	Diperta

**Tabel 2.** Penentuan genom kultivar pisang berdasarkan fragmen pemotongan daerah ITS DNA ribosom menggunakan enzim *RsaI*

Kultivar pisang	Fragmen pemotogan ITS DNA ribosom menggunakan <i>RsaI</i>			Genom
	530 bp	350 bp	180 bp	
Barley	xx	-	-	AA/AAA
Nona	xx	-	-	AA
Lampung	xx	-	-	AA
Ketip gunung sari	xx	-	-	AA/AAA
Ampyang	xx	-	-	AAA
Angkleng	xx	-	-	AAA
Poto	xx	-	-	AAA
Kapal	xx	x	x	AAB
Raja sableng	xx	x	x	AAB
Lase	xx	x	x	AAB
Raja solok	xx	x	x	AAB
Kepok awu	xx	xx	xx	ABB
Raja bandung	xx	xx	xx	ABB
Prabumulih	xx	xx	xx	ABB
Sobo londoh putih	xx	xx	xx	ABB



**Tabel 3.** Perbandingan genom kultivar pisang didasarkan pada mikrosatelit dan PCR-RFLP daerah ITS DNA ribosom

Kultivar pisang	Genom berdasarkan mikrosatelit*	Genom berdasarkan RCR-RFLP daerah ITS DNA ribosom
Barley	AA/AAA	AA/AAA
Nona	AA	AA
Lampung	AA	AA
Ketip Gunung Sari	AA/AAA	AA/AAA
Ampyang	AAA	AAA
Angkleng	AAA	AAA
Poto	AAA	AAA
Kapal	AAB	AAB
Raja Sableng	AAB	AAB
Lase	AAB	AAB
Sobo Londoh Putih	AAB	AAB
Kepok Awu	ABB	ABB
Raja Bandung	ABB	ABB
Prabumulih	ABB	ABB
Kepok Klutuk	ABB	ABB

genetik genom kultivar pisang yang didasarkan pada PCR-RFLP daerah ITS DNA ribosom dengan nilai koefisien kemiripan antara 0.804-1.00. Pengklasifikasian 15 kultivar pisang dapat dibedakan menjadi kelompok genom AA/AAA, AAB dan ABB. Penentuan tersebut didasarkan fragmen yang ditemukan untuk genom A terletak pada fragmen 530 bp, B<sub>1</sub> pada 350 bp dan B<sub>2</sub> pada fragmen 180 bp. Perbandingan pengklasifikasian genom yang didasarkan pada mikrosatelit dan PCR-RFLP daerah ITS DNA ribosom menunjukkan hasil yang sama, sehingga diharapkan penelitian selanjutnya mengenai analisis keanekaragaman pisang dapat digunakan metode PCR-RFLP daerah ITS karena lebih efisien waktu dan biaya. Analisis ketebalan pita-pita DNA perlu dilakukan secara kuantitatif menggunakan realtime PCR

#### Daftar Pustaka

- Azrai M. 2005. Pemanfaatan marka molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *J Agrobiogen* 1(1): 26-37
- Chikmawati T, Megia R, Widyastuti U, Farikhati IN. 1998. Kariotipe *Musa acuminata* "Mas Jambé" dan *M. balbisiana* "Klutuk Wulung". *Hayati* 5: 54-57
- Darmono TW. 1996a. Analisis keanekaragaman genetik tanaman dengan teknik molekuler. *Hayati*: 7-11
- \_\_\_\_\_. 1996b. *Pemanfaatan PCR untuk analisis keanekaragaman tanaman*. Seminar Sehari Pemanfaatan PCR dalam Analisis Keanekaragaman Hayati. Bogor: 20 Maret 1996
- Gawel N & Jarret RL. 1991. Cytoplasmic genetic diversity in bananas and plantains. *Euphytica* 59:19-23
- Hidayat T, Kusumawaty D, Kusdianti, Din Y, Agusthina M, Mariana D. 2008. Analisis filogenetik molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) menggunakan urutan basa DNA daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). *J Matematika & Sains* 13(1): 16-21
- Horry JP. 1989. Chimiotaxonomie et organisation genetique dans le genre *Musa*. *Fruits* 44: 455-474.
- [INIBAP] International Network for Improvement of Banana and Plantain. 2003. Banana diversity. <http://www.inibap.org>. [diakses tanggal 25 Nopember 2009]
- Jarret RL & Litz RE. 1986a. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35: 539-549
- Jarret RL & Litz RE. 1986b. Enzyme polymorphism in *Musa acuminata* Colla. *J Hered* 77: 183-186
- Jumari & Pudjoarinto A. 2000. Kekerabatan genetik kultivar pisang di Jawa. *Biologi* 2(9): 531-542
- Kaemmer D, Fischer D, Jarret RL, Baurens FC, Grapin A, Dambler D, Noyer JL, Lanaud C, Kahl G, & Lagoda PJJ. 1997. Molecular breeding in the genus *Musa*: A strong case for STMC marker technology. *Euphytica* 96: 49-63
- Kasper Y & Lenz C. 2004. Stable 8-year storage of DNA

- purified with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *QIAGEN News*. 2004 e10
- Lysak MA, Dolezoleva M, Horry JP, Swennen R, & Dolezel V. 1999. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor Appl Genet*. 98: 1344-1350
- Megia R, Sulistyarningsih CY, & Djuita N. 2001. Isozyme polymorphism for cultivar identification in Indonesia bananas. *Hayati* (8): 81-85
- Megia R. 2005. *Musa* sebagai model genom. *Hayati*. 12: 167-170
- Nasution RE & Yamada I. 2001. *Pisang-pisang Liar di Indonesia*. Bogor: Puslitbang Biologi LIPI
- Nwakanma DC, Pillay M, Okoli BE, & Tenkuano A. 2003. PCR-RFLP of the ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) provide markers for the A and B genomes in *Musa L*. *Theor Appl Genet* (DEU) (1): 154-159
- Pillay MA, Tenkuano A, Ude G, Ortiz R. 2006. Molecular Characterization of Genomes in *Musa* and Amplifications. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture (IITA)
- Rao NK. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African J Biotechnol* 3(2): 136-145
- Retnoningsih A, Megia R, Rifai MA, Hartana A. 2009. *Klasifikasi dan Analisis Filogeni Kultivar Pisang Indonesia Berdasarkan Penanda Molekuler*. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Siddiqah M. 2002. *Biodiversitas dan Hubungan Kekerabatan Berdasarkan Marker Morfologi Berbagai Plasma Nutfah Pisang*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Simmonds NM. 1962. *The Evolution of The Bananas*. London: Longman. Inc
- Solihin DD. 2005. *Prinsip-prinsip dalam Teknologi Biologi Molekuler*. Pelatihan Tingkat Teknik Biologi Molekuler Eksplorasi Sumberdaya Genetik Menggunakan Marka Molekuler. Bogor. 12-17 Desember 2005
- Stover RH & Simmonds NW. 1987. *Banana*, 3rd Edition. UK: Longmans Scientific and Technical.
- Sudarnadi H. 1995. *Tumbuhan Monokotil*. Bogor: Penebar Swadaya
- Sulandari S & Zein MSA. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. Bogor: Bidang Zoologi LIPI
- Tripathi L. 2003. Genetic engineering for improvement of *Musa* production in Africa. *African J Biotechnol* 12: 503-508
- Valmayor RV, Jamaluddin SH, Silayoi B, Kusumo S, Danh LD, Pascua OC, & Espino RRC. 2000. *Banana cultivar names and synonyms in Southeast Asia*. Los Banos: INIBAP
- Yunus M. 2004. *Marka molekuler untuk perbaikan tanaman*. Lokakarya Teknik Dasar Molekuler untuk Pemuliaan Tanaman: Bogor 19-23 Juli